

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ
КАФЕДРА ПЕДІАТРІЇ

ЗАТВЕРДЖУЮ
директор Медичного інституту
д.мед.н., професор
_____ А.М. Лобода

" ____ " _____ 2021 р.

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ
ПРИ ПІДГОТОВЦІ ДО ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ З
ДИСЦИПЛІНИ «СУЧАСНІ МЕТОДИ ГЕНЕТИЧНОЇ
ДІАГНОСТИКИ»

Суми, 2021 рік

Змістовий модуль 1 . Синдромологічний аналіз

Конкретні цілі:

- Засвоїти алгоритм сомато-генетичного обстеження хворого та членів його родини.
- Застосовувати системний підхід при обстеженні хворого та членів його родини.
- Визначати провідний клінічний симптомокомплекс при проведенні оцінки фенотипу пробанда та його сім'ї.
- Засвоїти алгоритм складання родоводу та легенди до родоводу.
- Проводити клініко-генеалогічний аналіз родоводу.
- Засвоїти навички роботи з діагностичними каталогами.
- Знати та володіти алгоритмами проведення синдромологічного аналізу в процесі діагностики спадкової патології.

Тема 1. Методологія обстеження хворого з підозрою на спадкову патологію. Проведення аналізу фенотипічних особливостей пробанда та членів його сім'ї.

Студент повинен знати:

1. Алгоритм сомато-генетичного обстеження хворого та членів його родини, системний підхід при обстеженні хворого та членів його родини.
2. Методологія обстеження хворого з підозрою на спадкову патологію: скарги та особливості анамнезу про банду та родини про банду при спадковій патології.
3. Системну оцінку фенотипічних особливостей про банду у відповідності до розробленого алгоритму обстеження.

Короткий виклад теоретичного матеріалу

Медико-генетичне консультування складається з декількох етапів:

- 1) перший, найбільш важливий етап, полягає в постановці діагнозу спадкового захворювання і визначенні типу його успадкування. Перший етап медико-генетичного консультування полягає у всебічному обстеженні хворого, направленому на уточнення діагнозу. Значну увагу на цьому етапі приділяється збору генеалогічної інформації та анамнестичних даних. Припущення про спадкоємний характер захворювання та встановлення типу його наслідування може бути зроблено на підставі аналізу родоводу пробанда і ретельному обстеженні всіх членів, проводять консультації сім'ї. При наявності сегрегації захворювання в родоводі можна з високою часткою ймовірності прогнозувати генотип усіх родичів пробанда.
- 2) другий етап передбачає встановлення генотипів консультуючих та членів їх сімей з подальшим розрахунком ризику виникнення захворювання.;
- 3) на третьому етапі досліджується можливість профілактичних заходів, і визначається найбільш ефективний спосіб їх проведення.

Крім цих трьох основних завдань велике значення при консультуванні має психологічна та правова допомога. Необхідно пояснити консультуючим та членам їх сімей сенс результатів генетичних аналізів, допомогти у вирішенні морально-етичних і правових проблем, надати психологічну допомогу з вирішення питань планування сім'ї, соціальної адаптації тощо.

Уточнення нозологічної форми спадкового захворювання має проводитися з використанням всіх доступних методів обстеження. В першу чергу здійснюється клінічний огляд хворого та членів його сім'ї з метою виявлення фенотипічних проявів хвороби. Враховуючи варіюючу експресивність більшості спадкових патологій, особливе значення має надаватися ретельності фізикального обстеження, при якому необхідно звертати увагу на найменші ознаки хвороби. Лікар-генетик повинен бути ознайомлений з усіма клінічними симптомами спадкових захворювань і враховувати можливість

існування стертих та атипичних форм. Етап постановки діагнозу може бути обмежений використанням тільки клінічного обстеження хворого.

Це відбувається у двох випадках:

- 1) якщо фенотипічні прояви захворювання дозволяють чітко й однозначно поставити діагноз і родина не має потребу в допологовій діагностиці;
- 2) якщо етіологія і патогенез захворювання не відомі і використання додаткових генетичних методів для уточнення діагнозу неможливо.

Іноді для уточнення діагнозу необхідні додаткові консультації фахівців різного профілю (офтальмолога, невропатолога, ортопеда та ін), а також лабораторне та інструментальне обстеження. В останні роки при проведенні діагностичної процедури досить широко використовуються комп'ютерні бази даних та інформаційно-діагностичні системи, такі як POSSUM, LDDDB, SYNGEN, CHRODYS, MEDGEN і другі.

Більшість спадкових хвороб має хронічний перебіг, внаслідок чого повторна обертаність при таких хворобах висока. Особливо багато хворих із спадковими формами захворювань надходить в спеціалізовані клінічні та діагностичні відділення. У той же час, як показує аналіз контингенту хворих, спадкові форми діагностуються не завжди, навіть у клінічних умовах. Певною мірою це зрозуміло, оскільки діагностика спадкової патології - складний і трудомісткий процес.

Труднощі діагностики зумовлені насамперед тим, що нозологічний спектр спадкових хвороб, кожна з яких характеризується великою різноманітністю клінічної картини, дуже широкий (більше 3500 форм). Так, у групі нервових хвороб відомо понад 300 спадкових форм, у дерматології - понад 250, в офтальмології - понад 250. Деякі форми зустрічаються вкрай рідко, і лікар у своїй практиці може не зустрітися з ними. У зв'язку з таким розмаїттям і подібністю деяких спадкових форм з неспадковими хворобами (фенокопії), а також у зв'язку з наявністю рідко зустрічаються спадкових хвороб (1:200 000) лікар не може активно володіти всім запасом знань, необхідних для діагностики не тільки всіх спадкових хвороб, але навіть і рідкісних форм за його фахом.

Клінічна діагностика спадкових хвороб ґрунтується на даних клінічного, генеалогічного та параклінічного обстеження.

Щоб не «пропустити» спадкову хворобу, лікар повинен пам'ятати про те, що спадкові хвороби можуть протікати під «маскою» неспадкових. У ряді випадків спадкова патологія може супроводжувати основному, неспадкової захворювання, з приводу якого хворий звернувся до лікаря.

Тому хід постановки діагнозу повинен бути двохетапним:

1. Загальне клінічне обстеження хворого відповідно до сучасних вимог, описаними у відповідних посібниках;
2. При підозрі на конкретну спадкову хворобу необхідно проведення спеціалізованого диференційно-діагностичного обстеження.

При загальному клінічному обстеженні будь-якого хворого постановка діагнозу повинна завершитися одним з трьох висновків:

1. Чітко поставлено діагноз неспадкової захворювання;
2. Чітко поставлено діагноз спадкової хвороби;
3. Є підозра, що основна або супутня хвороба спадкова.

Перші дві групи висновків складають переважну частину при обстеженні хворих. Третя група, як правило, вимагає застосування спеціальних, додаткових методів обстеження (параклінічних, лабораторно-генетичних).

Загальні клінічні методи також часто є основними в діагностиці найбільш відомих і поширених спадкових хвороб. Клінічна картина останніх була добре відома ще до встановлення спадкової природи. Наприклад, синдром Дауна (трисомія 21) з великою ймовірністю може бути діагностований тільки на підставі даних клінічного обстеження хворого. У той же час відомі випадки помилкової діагностики синдрому Дауна, особливо на 1-му році життя. Такий діагноз (без аналізу каріотипу) тільки на підставі

«особливостей» рис обличчя без урахування інших ознак, характерних для синдрому Дауна, іноді ставлять хворим з вродженим гіпотиреозом.

Повного клінічного обстеження, включаючи параклінічне, зазвичай достатньо для діагностики таких спадкових захворювань, як ахондроплазія, нейрофіброматоз, хорея Гентінгтона, ретинобластома, бульозний епідермоліз і т. д. Діагностика таких «класичних» випадків, як правило, утруднені у лікаря не викликає. Однак не слід забувати, що при цьому можливі діагностичні помилки, особливо часто зустрічаються при неповному прояві того чи іншого синдрому або у випадках, коли є інші, подібні за клінічними ознаками спадкові хвороби.

Здавалося б, виходячи з логіки вищевикладеного, вичленення спадкових форм захворювання - не таке вже важка справа, але насправді це не так. Здаються на перший погляд неспадкових захворювання можуть бути ускладненням або проявом прихованого спадкового патологічного процесу. Ось кілька прикладів цього.

Гостра пневмонія часто виникає у хворих із хромосомними захворюваннями, з генералізованою патологією сполучної тканини, із спадковими хворобами обміну речовин, і вона частіше, ніж у здорових осіб, набуває затяжного або хронічного перебігу. Пієлонефрит частіше виникає, а потім вже рецидивує у хворих з вродженими аномаліями сечової системи. Порушення ритму серця може бути проявом синдрому Елерс-Данло, спадкового подовженого інтервалу Q-T.

Якщо не звертати уваги на «фон», на якому виникає і розвивається захворювання, включаючи як самого хворого, так і його кровних родичів, буде пропущено дуже багато спадкових хвороб. А це означає, що не буде проводитися патогенетична терапія, буде неправильно оцінений прогноз захворювання, не будуть дані певні рекомендації з профілактики ускладнень, працевлаштування і т. д.

Фенотип — сукупність характеристик, властивих індивіду на певній стадії розвитку. Будь-яка спостережувана характеристика чи риса організму: як-то його морфологія, розвиток, біохімічні та фізіологічні властивості чи поведінка. Фенотипи формуються під дією генотипу, опосередкованого низкою факторів довкілля та можливими взаємодіями між ними двома. Усі клінічно визначувані ознаки індивіда: зріст, вага тіла, колір очей, форма волосся, група крові, тощо — є фенотипними.

Фенотипічні аномалії:

Алопеція - відсутність волосся, полисіння.

Аніридія - відсутність райдужної оболонки ока.

Анкілоз - нерухомість суглобів.

Анодонтія - відсутність зубів.

Аноніхія - відсутність нігтя на одному, кількох чи всіх пальцях.

Аплазія - природжена відсутність органа.

Арахнодактилія - довгі, тонкі пальці кистей та стоп.

Атрезія - відсутність чи закриття природного каналу чи отвору.

Блефарофімоз - звуження щілини ока.

Брахідактилія - короткопалість.

Брахіцефалія - збільшення поперечного розміру голови.

Вігиліго - поява на шкірі депігментованих ділянок.

Гіпергідроз - надмірна пітливість.

Гіпертелоризм - аномальна відстань між парними органами (очі, грудні соски).

Гіпертрихоз - надмірний ріст волосся.

Гіпогевзія - зниження смаку.

Гіпоспадія - нижня розщелина уретри.

Гіпотрихоз - недостатній ріст волосся.

Гірсутизм - аномальне оволосішся, збільшений ріст волосся.

Доліхостеномелія - довгі, тонкі кінцівки.

Доліхоцефалія - подовжена форма черепа.

Іридодонез - дрижання райдужки при вивиху кришталика ока.
Крипторхізм - затримка яєчка на його природному шляху спускання в калитку.
Криптофтальм - природжене повне зрощення повік.
Макрогловія - надмірне збільшення язика з виразною склад-чатістю слизової оболонки.
Макросомія (гігантизм) - збільшення розмірів тіла, внутрішніх органів.
Макростомія - надмірне збільшення ротової щілини.
Мікрогловія - аномально зменшений язик.
Мікрогнатія - недорозвиненість верхньої щелепи.
Мікромелія - аномальне зменшення або укорочення кінцівок.
Мікрофтальм - зменшення всіх розмірів ока.
Мікроцефалія - аномально зменшена голова.
Ністагм - мимовільний швидкий рух очних яблук, горизонтальний чи вертикальний.
Полідактилія (багатопалість) - збільшення кількості пальців на кистях чи стопах.
Птоз - опущення верхньої повіки.
Прогнатія - надмірний виступ нижньої щелепи.
Ретрогнатія - зміщення верхньої щелепи назад, порівняно із звичайним абрисом.
Синдактилія - зрощення двох чи більше пальців частково або повністю.
Синофронт - збільшення та зрощення брів.
Сиреномелія - злиття нижніх кінцівок.
Страбизм - косоокість.
Телекант - збільшення відстані між внутрішніми кутками очей при нормально розташованих орбітах.
Циклопія - одне або подвоєне око, що розташоване посередині лоба.

Тема 2. Клініко-генеалогічний аналіз

Студент повинен знати:

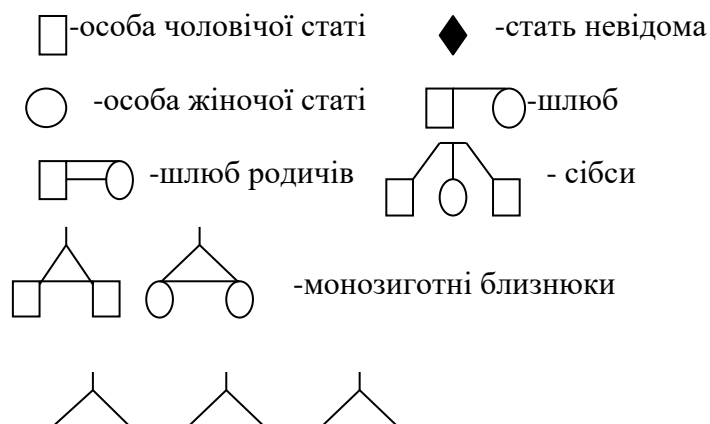
1. Системну оцінку фенотипічних особливостей про банду у відповідності до алгоритму обстеження.
2. Генні захворювання з різними типами успадкування.

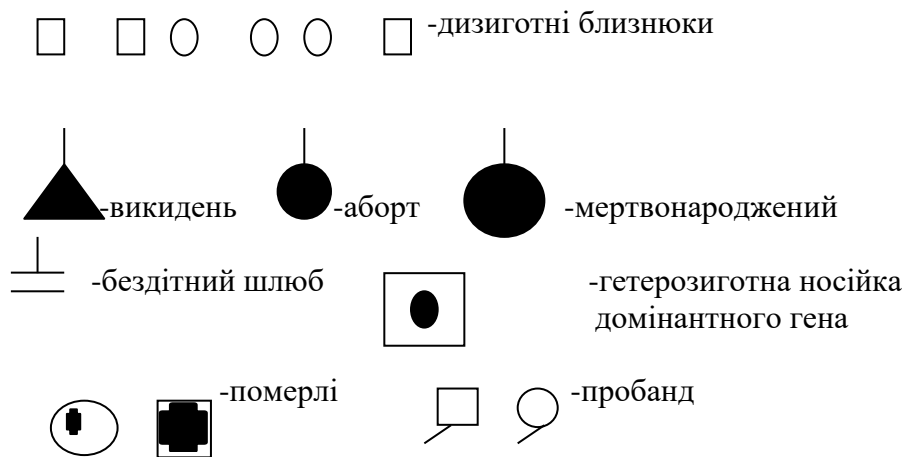
Короткий виклад теоретичного матеріалу:

Клініко-генеалогічний метод є головним важелем у медичній генетиці. Більшість діагнозів спадкової патології можна встановити саме за допомогою цього методу аналізу. Він вимагає повного та уважного обстеження хворого, цілеспрямованого збирання анамнезу (про репродукційну функцію та наявність аналогічних уражень серед членів ядерної родини та ряду поколінь за материнською й батьківською лініями), а також клінічного обстеження та інтерв'ювання усіх можливих для цього родичів пробанда.

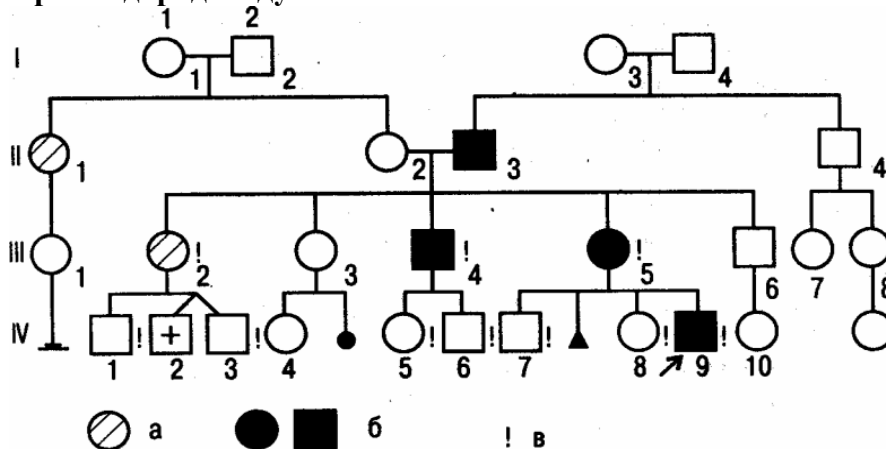
Родовід має бути вивченим за вертикаллю (від покоління до покоління) та за горизонталлю (в межах окремих поколінь).

При складанні родоводу використовують символи (запропоновані Г.Юст, 1931 р.):





Приклад родоводу



Позначення стандартні а - хворі на діабет; б - хворі на нейрофіброматоз; в - особисто обстежені.

На основі медичного висновку вимальовується фенотип пробанда за особливою схемою, що відрізняється від записів в історії хвороби, зроблених лікарями не генетиками. Опис фенотипу починається з оцінки поведінки, фізичного розвитку (зріст, маса тіла), контактності хворого, його психічного стану та розумового розвитку залежно від віку. Далі лікар має звернути увагу та відмітити особливості зовнішності пробанда: форма черепа, ріст волосся, його структура і розміщення; форма та розташування вушних раковин (насідки на мочці вуха), брів, очних щілин та відстань між ними. Треба описати форму лоба, носа, ротової щілини, губів, язика, нижньої та верхньої щелеп; наявність, кількість, особливості форми і росту зубів; тверде піднебіння, щілини губи та (чи) піднебіння; форму та розміри шії, грудної клітки, хребта. Необхідно також детально обстежити верхні та нижні кінцівки, описати їх форму, кількість пальців, дерматогліфічні особливості (рисунок) долоней та підшв, позиції долоней, підшв.

Потім увага лікаря приділяється стану шкіри: відмічається її еластичність (чи навпаки), ріст волосся, вологість, пігментація, наявність атипичних складок, висипання.

Усі відмічені симптоми відповідно записуються спеціальними термінами, що наведені у розділі «Генетичний глосарій». Можливість встановити точний діагноз великою мірою залежить від того, наскільки повно виявлені мікроаномалії розвитку, на які лікарі зазвичай не звертають належної уваги.

Дослідження стану внутрішніх органів традиційними методами пальпації, перкусії та аускультатії завершують клінічне обстеження пробанда. З анамнезу принципового значення набувають відомості про перебіг вагітності, строк пологів, маса та зріст дитини при народженні, акушерсько-гінекологічний анамнез матері та родини.

Опитування і клінічне обстеження якомога більшої кількості родичів пробанда має на меті виявлення носіїв патологічних генів як рецесивних, так і домінантних, втім і зчеплених зі статтю. Рецесивні алелі клінічно проявляються тільки в гомозиготному стані (має значення спорідненість батьків), домінантні - як в гомозиготному, так і в гетерозиготному наборі. Разом з тим наявність та ступінь виразності клінічної симптоматики залежить від пенетрантності та експресивності певного гена.

Пенетрантність - частота або ймовірність прояву будь-якого домінантного гена, вона позначається процентним відношенням кількості осіб, у яких ген проявляється у фенотипі, до всіх носіїв цього гена. Експресивність - ступінь фенотипового прояву гена, міра сили гена, що визначається ступенем розвитку ознаки.

У медичній генетиці термін «експресивність» використовується стосовно повноти виявлення синдрому, а не тільки певного симптому, бо саме синдром, а не симптом є наслідком однієї мутації (при менделюючих хворобах). Часто експресивність моногенного синдрому залежить від статі пробанда. Результатом клініко-генеалогічного обстеження родини є запис фенотипу, родовід, визначення типу успадкування патології та попередній діагноз. Під час складання родоводу використовуються графічні символи. У родоводі (генеалогічному дереві) покоління позначаються римськими цифрами, починаючи з покоління пробанда (0), а кожна людина в одному поколінні - арабськими цифрами. Особа (пробанд), що звернулася до лікаря, відмічається стрілкою. Таким чином, кожна особа з обстеженої родини має свій номер, що відбиває його місце у родоводі.

Після встановлення на I етапі попереднього діагнозу (на основі клініко-генеалогічного аналізу) необхідно провести диференційовану діагностику з подібними за клінікою синдромами, генокопіями та фенкопіями цієї патології, з метою верифікації діагнозу. При цьому широко застосовуються консультації відповідних спеціалістів: офтальмолога, невропатолога, психіатра, кардіолога, ортопеда та інших, склад яких визначається в кожному окремому випадку. Такому пробанду та членам родини призначаються лабораторні та апаратурні дослідження: рентгенографія черепа, кінцівок, хребта (встановлення кісткового віку, виявлення аномалій), ультразвукове дослідження, загальні аналізи крові і сечі, функціональне та лабораторне обстеження серцево-судинної, травної, дихальної, імунної, ендокринної, сечо-статевої та центрально-нервової систем.

I знову ж обсяг та комплекс цих обстежень у кожному випадку ґрунтується на конкретних гіпотезах щодо діагнозу, наявності - відсутності змін, що характерні для підозрюваної патології. Ці дії складуть II етап медико-генетичного обстеження. У деяких випадках вирішальним може бути результат аналізу ендокринного статусу хворого, в інших - імунного статусу чи гістологічного дослідження біопсійного матеріалу. Встановити діагноз в родинах, що раніше мали випадки дитячої смертності істотно допоможуть протоколи розтину.

Більшість спадкових синдромів зустрічається в популяції дуже рідко (IxЮ3 - IxЮ6), тому для верифікації діагнозу слід порівнювати конкретний випадок, з описаними в літературі (атласи, монографії, каталоги, комп'ютерні діагностичні програми, наприклад, «Possum»). У разі спадкової патології точність діагнозу визначає не тільки тактику лікування хворого, прогноз його життя та перебігу хвороби, але й успішність медико-генетичного консультування як хворого (формування адаптивного середовища, вибір професії, подружньої пари, прогноз дітонародження), так і членів його родини - вчасне виявлення уражених індивідуумів, пренатальна діагностика, профілактичне лікування, прекоцепційна профілактика, ступінь ризику народження хворих дітей.

Вище викладене дозволяє зробити висновок: діагностика спадкової патології, успішність її лікування та попередження залежить передусім від компетентності, освіченості лікаря, володіння генетичним мисленням більшою мірою, ніж від наявності дорогої апаратури, реактивів, спеціалізованих установ тощо.

Ознаками автосомно-домінантного типу успадкування є:
-хвороби трапляються у кожному поколінні (вертикальний тип спадковості),

- співвідношення хворих і здорових 1:1, здорові діти хворих батьків народжують здорових дітей,
- співвідношення хворих хлопчиків і дівчаток 1:1, хворі чоловіки і жінки однаково передають хворобу своїм дітям - як хлопчикам, так і дівчаткам,
- чим тяжча хвороба позначається на репродукції, тим більша пропорція спорадичних випадків (нових мутацій),
- гомозиготи народжуються від двох хворих батьків, перебіг хвороби у них важчий, ніж у гетерозигот.

Найбільш поширені хвороби, які успадковуються за аутосомно-домінантним типом: нейрофіброматоз 1-го та 2-го типів, синдроми Марфана, Елерса - Данлоса, ахондроплазія, недосконалий остеогенез, міотонічна дистрофія, хорея Гентінгтона та інші.

Ознаками аутосомно-рецесивного типу успадкування є :

- передача хвороби „по горизонталі”, навіть при достатній кількості потомків ознаки може не бути у дітей, але вона з’являється в онуків,
- батьки зазвичай клінічно здорові,
- чим більше дітей у родині, тим частіше в ній понад одну хвору дитину,
- чим частіше трапляється мутагенний ген у популяції, тим частіше батьки хворих дітей є кровними родичами,
- якщо хворі і чоловік, і дружина, то всі діти будуть хворими,
- у шлюбі хворого зі здоровим народжуються нормальні діти (якщо здоровий не гетерозиготний носій патологічного гена),
- у шлюбі хворого з носієм мутантного алеля народжується 50% хворих дітей, що імітує домінуючий тип успадкування,
- обидві статі уражуються однаково.

До хвороб, які успадковуються аутосомно-рецесивно, належать: муковісцидоз, фенілкетонурія, галактоземія, гепатолентикулярна дегенерація (хвороба Вільсона-Коновалова), синдром Барде-Бідля (ожиріння, гіпогеніталізм, розумова відсталість, пігментна дегенерація сітківки, полідактилія), адрено-генітальний синдром, мукополісахаридози.

Ознаки, гени яких розташовані не в автосомах, а в статевих хромосомах (X і Y), називають зчепленими зі статтю.

Ознаками X-зчепленого домінуючого типу успадкування є:

- хворих жінок удвічі більше, ніж чоловіків,
- хвора жінка передає патологічну ознаку 50% синів і 50% дочок,
- хворий чоловік передає патологічну ознаку всім дочкам і не передає синам,
- жінки (вони гетерозиготні) хворіють частіше менш тяжко, ніж чоловіки (вони гомозиготні).

До найбільш частих хвороб, які успадковуються X-зчеплено домінуючно відносять: вітамін D-резистентний рахіт (спадкова гіпофосфатемія), нетримання пігменту, рото-лице-пальцевий синдром, фокальна шкірна гіпоплазія.

Характерні риси X-зчепленого рецесивного типу успадкування:

- хворіють тільки хлопчики,
- близько 2/3 випадків „завдячують” матерям-носіям, 1/3 – новим мутаціям в X-хромосомі матері,
- у разі успадкування у хворих хлопчиків можуть бути хворі брати і дядьки по матері,
- сестри хворих братів у разі успадкування мають 50% вірогідність також бути носіями патологічного алеля,
- здорові чоловіки не передають хвороби,
- частка випадків успадкування становить понад 2/3,
- хворі чоловіки передають патологічний алель усім своїм дочкам і нікому із синів,
- усі фенотипічно нормальні дочки хворих чоловіків є носіями,

-у шлюбі жінки-носія з хворим чоловіком 50% дочок хворі, а 50% носії, 50% синів хворі і 50% здорові.

Хвороби, які успадковуються Х-зчеплено-рецесивно: розумова відсталість з ламкою Х-хромосою, гемофілія, м'язова дистрофія Дюшена, синдром Хантера (мукополісахаридоз II типу), синдром Леша-Ніхана.

Ознаками Y-зчепленого типу успадкування є:

-хворіють лише хлопчики,

-хворий чоловік передає патологічну ознаку (якщо не порушена фертильність) всім синам і не передає дочкам.

Ознаками мітохондріальної спадковості є:

-хвороба передається тільки від матері,

-хворіють і хлопчики і дівчатка,

-хворі чоловіки не передають хворобу.

У практиці лікаря-генетика нерідко зустрічаються випадки, коли виявлений характер передачі захворювання не підпорядковується класичним методам успадкування. Встановлено, що деякі гени, що передаються нащадкам, несуть специфічний відбиток статі батька. Це свідчить, що деякі батьківські і материнські гени мають різні ефекти, тобто проявляються у нащадків по-різному. Це явища одержало назву геномного імпринтингу. Таким чином, деякі гени передаються дітям від одного з батьків у неактивному стані. Неактивна копія гена називається імпритированою. Встановлено близько 30 генів, які по-різному проявляються на батьківських та материнських хромосомах. Класичним прикладом хвороб імпринтинга є спадкові синдроми Прадера-Віллі та Ангельмана, основними клінічними ознаками яких є розумова відсталість різного ступеня разом з тяжкими неврологічними порушеннями. Найбільш частою причиною синдромів є внутрішньохромосомна делеція критичного регіону (q11-q13) хромосоми 15. Ця делеція характерна для 2/3 всіх хворих. Синдром Прадера-Віллі розвивається, коли дитина успадковує делецію, яка виникла на батьківській хромосомі 15, а причиною синдрому Ангельмана є делеція тієї ж ділянки на материнській хромосомі 15. Тобто, виникнення цих клінічно різних синдромів залежить від хромосомної перебудови у батьків (батька та матері).

Хвороби експансії (збільшення числа копій ділянок ДНК, які повторюються (повтори) в індивідумів у наступних поколіннях. Феномен експансії числа тринуклеотидних повторів (ЦГГ) був уперше виявлений при молекулярно-генетичному дослідженні синдрому Мартин-Белл (синдром ломкої Х-хромосоми). Передача від матері. Крім названого синдрому, відомі інші захворювання експансії тринуклеотидних повторів (міотонічна дистрофія (19q13.3), хорея Гентингтона (4p16.3) та деякі інші.

Особливостями клінічних проявів спадкової патології є:

-сімейних характер захворювання,

-хронічний, рецидивуючий перебіг,

-наявність специфічних симптомів,

-численні патологічні зміни органів і систем,

-природжений характер хвороби,

-резистентність до найпоширеніших методів терапії.

У спадкових хвороб не існує патогномонічних ознак. Частіше за все одні і ті ж симптоми зустрічаються при кількох або навіть багатьох хворобах. Наприклад, деформації хребта зустрічаються більше, ніж при 50 спадкових захворювань.

Семіотика спадкових хвороб вивчає ознаки (симптоми) спадкових хвороб і патологічних станів, викликаних впливом спадкових факторів і факторів середовища. У клінічній генетиці широко використовується поняття «синдром», яке вживається вже не стільки для позначення сукупності симптомів, об'єднаних одним патогенезом, скільки для позначення самостійних нозологічних одиниць. Багато нозологічно ідентифікованих спадкових

хвороб називають синдромами (наприклад, хвороба чи синдром Дауна). Критерієм виділення синдромів є стійке сполучення симптомів, включаючи МАР.

У генетиці використовується синдромологічний аналіз, під яким слід розуміти узагальнений аналіз усіх клінічних проявів з метою виявлення сталого поєднання ознак для встановлення діагнозу

При спадкових хворобах характерний розвиток хронічного процесу внаслідок постійного впливу мутантного гена. Ступінь хронізації і прогресивності однієї і тієї самої хвороби у різних хворих різний, що пояснюється взаємодією генів (генотип кожної людини індивідуальний).

Характерним є рецидивуючий перебіг спадкової патології, зумовлений як генетичними факторами, так і факторами середовища. До генетичних факторів відносять особливості функціонування генів хворого, тобто регуляцію їх активності в межах, установлених генотипом.

Фактори середовища ускладнюють основний патологічний процес (активізація мікробного фактора, порушення харчування) та спричиняють додатковий пошкоджуючий вплив.

Необхідно хворого оглядати повністю. Наприклад, у хворого з вродженою вадою серця потрібно уважно оглянути руки: вкорочення 1 пальця кисті чи наявність трьох фаланг замість 2 наводить на думку про домінуючий успадкований синдром Холт-Орама (синдром “рука-серце”). Розумова відсталість - результат патології більше ніж 100 спадкових синдромів.

Тема 3,4. Методика складання родоводу. Робота з діагностичними каталогами. Синдромологічний аналіз

Студент повинен знати:

1. Алгоритм складання родоводу та легенд до родоводу.
2. Правила складання родоводу.
3. Символи, що використовуються при складанні родоводу.
4. Вимоги до легенд родоводу.

Короткий виклад теоретичного матеріалу

Основний метод генетичного аналізу у людини полягає в складанні і вивченні родоводу.

Генеалогія - це родовід. Генеалогічний метод - метод родоводів, коли простежується ознака (хвороба) у родині з вказівкою родинних зв'язків між членами родоводу. В його основу покладено ретельне обстеження членів родини, складання й аналіз родоводів.

Це найбільш універсальний метод вивчення спадковості людини. Він і використовується завжди при підозрі на спадкову патологію, дозволяє встановити:

- спадковий характер ознаки.
- тип успадкування і пенетрантність алеля.
- характер зчеплення генів і здійснювати картування хромосом.
- інтенсивність мутаційного процесу.
- розшарування механізмів взаємодії генів.
- його застосовують при медико-генетичному консультуванні (Н.П.Бочков, 1978).

Суть генеалогічного методу полягає у встановленні родинних зв'язків, простеження ознак або хвороби серед близьких і далеких, прямих і непрямих родичів.

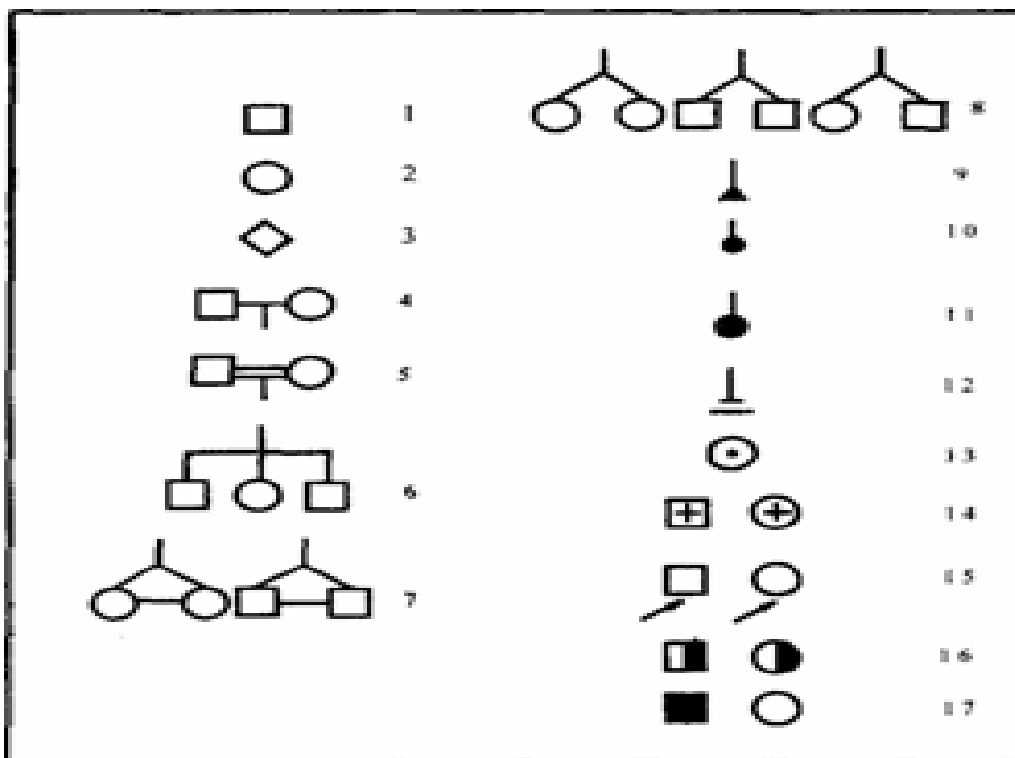
Він складається із двох етапів: складання родоводу і генеалогічного аналізу. Вивчення успадкування ознаки або захворювання у певній сім'ї розпочинається з суб'єкта, який має цю ознаку або захворювання.

Особина, яка першою попадає в поле зору генетика, називається пробандом. Це переважно хворий або носій дослідної ознаки. Діти однієї батьківської пари називаються сібсами пробанда (брати -сестри). Потім переходять до його батьків, далі до братів і

сестер батьків і їх дітей, потім до дідусів і бабусь і т.д. Складаючи родовід роблять короткі нотатки про кожного члена сім'ї, його родинні зв'язки з пробандом. Схема родоводу супроводжується позначеннями під рисунком і отримала назву **легенда**.

Символи, що використовуються при складанні родоводу:

1 - чоловіча стать. 2 - жіноча стать. 3 - стать невідома (інтерсекс). 4 - шлюб. 5 - родинний шлюб. 6 - сібси. 7 - монозиготні близнюки. 8 - дизиготні близнюки. 9 - викидень. 10 - аборт. 11 - мертвонароджений. 12 - бездітні шлюб. 13 - гетерозиготний носій мутантного гена в X-хромосомі. 14 - померлі. 15 - пробанд. 16- гетерозиготи. 17 - особи, які несуть патологічну ознаку або захворювання.



Клініко-генеалогічний метод є головним важелем у медичній генетиці. Більшість діагнозів спадкової патології можна встановити саме за допомогою цього методу аналізу. Він вимагає повного та уважного обстеження хворого, цілеспрямованого збирання анамнезу (про репродукційну функцію та наявність аналогічних уражень серед членів ядерної родини та ряду поколінь за материнською й батьківською лініями), а також клінічного обстеження та інтерв'ювання усіх можливих для цього родичів пробанда.

Родовід має бути вивченим за вертикаллю (від покоління до покоління) та за горизонталлю (в межах окремих поколінь).

На основі медичного висновку вимальовується фенотип пробанда за особливою схемою, що відрізняється від записів в історії хвороби, зроблених лікарями не генетиками. Опис фенотипу починається з оцінки поведінки, фізичного розвитку (зріст, маса тіла), контактності хворого, його психічного стану та розумового розвитку залежно від віку. Далі лікар має звернути увагу та відмітити особливості зовнішності пробанда: форма черепа, ріст волосся, його структура і розміщення; форма та розташування вушних раковин (насічки на мочці вуха), брів, очних щілин та відстань між ними. Треба описати форму лоба, носа, ротової щілини, губів, язика, нижньої та верхньої щелеп; наявність, кількість, особливості форми і росту зубів; тверде піднебіння, щілини губи та (чи)

піднебіння; форму та розміри шиї, грудної клітки, хребта. Необхідно також детально обстежити верхні та нижні кінцівки, описати їх форму, кількість пальців, дерматогліфічні особливості (рисунки) долоней та підшв, позиції долоней, підшв.

Потому увага лікаря приділяється стану шкіри: відмічається її еластичність (чи навпаки), ріст волосся, вологість, пігментація, наявність атипових складок, висипання.

Усі відмічені симптоми відповідно записуються спеціальними термінами, що наведені у розділі «Генетичний глосарій». Можливість встановити точний діагноз великою мірою залежить від того, наскільки повно виявлені мікроаномалії розвитку, на які лікарі зазвичай не звертають належної уваги.

Дослідження стану внутрішніх органів традиційними методами пальпації, перкусії та аускультатії завершують клінічне обстеження пробанда. З анамнезу принципового значення набувають відомості про перебіг вагітності, строк пологів, маса та зріст дитини при народженні, акушерсько-гінекологічний анамнез матері та родини.

Опитування і клінічне обстеження якомога більшої кількості родичів пробанда має на меті виявлення носіїв патологічних генів як рецесивних, так і домінантних, втім і зчеплених зі статтю. Рецесивні алелі клінічно проявляються тільки в гомозиготному стані (має значення спорідненість батьків), домінантні - як в гомозиготному, так і в гетерозиготному наборі.

Разом з тим наявність та ступінь виразності клінічної симптоматики залежить від пенетрантності та експресивності певного гена.

Пенетрантність - частота або ймовірність прояву будь-якого домінантного гена, вона позначається процентним відношенням кількості осіб, у яких ген проявляється у фенотипі, до всіх носіїв цього гена. Експресивність - ступінь фенотипового прояву гена, міра сили гена, що визначається ступенем розвитку ознаки.

У медичній генетиці термін «експресивність» використовується стосовно повноти виявлення синдрому, а не тільки певного симптому, бо саме синдром, а не симптом є наслідком однієї мутації (при менделюючих хворобах). Часто експресивність моногенного синдрому залежить від статі пробанда. Результатом клініко-генеалогічного обстеження родини є запис фенотипу, родовід, визначення типу успадкування патології та попередній діагноз. Під час складання родоводу використовуються графічні символи. У родоводі (генеалогічному дереві) покоління позначаються римськими цифрами, починаючи з покоління пробанда (0), а кожна людина в одному поколінні - арабськими цифрами. Особа (пробанд), що звернулася до лікаря, відмічається стрілкою. Таким чином, кожна особа з обстеженої родини має свій номер, що відбиває його місце у родоводі.

Після встановлення на I етапі попереднього діагнозу (на основі клініко-генеалогічного аналізу) необхідно провести диференційовану діагностику з подібними за клінікою синдромами, генокопіями та фенокопіями цієї патології, з метою верифікації діагнозу. При цьому широко застосовуються консультації відповідних спеціалістів: офтальмолога, невропатолога, психіатра, кардіолога, ортопеда та інших, склад яких визначається в кожному окремому випадку. Такому пробанду та членам родини призначаються лабораторні та апаратурні дослідження: рентгенографія черепа, кінцівок, хребта (встановлення кісткового віку, виявлення аномалій), ультразвукове дослідження, загальні аналізи крові і сечі, функціональне та лабораторне обстеження серцево-судинної, травної, дихальної, імунної, ендокринної, сечо-статевої та центрально-нервової систем.

I знову ж обсяг та комплекс цих обстежень у кожному випадку ґрунтується на конкретних гіпотезах щодо діагнозу, наявності - відсутності змін, що характерні для підозрюваної патології. Ці дії складуть II етап медико-генетичного обстеження. У деяких випадках вирішальним може бути результат аналізу ендокринного статусу хворого, в інших - імунного статусу чи гістологічного дослідження біопсійного матеріалу. Встановити діагноз в родинах, що раніше мали випадки дитячої смертності істотно допоможуть протоколи розтину.

Більшість спадкових синдромів зустрічається в популяції дуже рідко (ІхЮЗ - ІхЮБ), тому для верифікації діагнозу слід порівнювати конкретний випадок, з описаними в літературі (атласи, монографії, каталоги, комп'ютерні діагностичні програми, наприклад, «Possum»). У разі спадкової патології точність діагнозу визначає не тільки тактику лікування хворого, прогноз його життя та перебігу хвороби, але й успішність медико-генетичного консультування як хворого (формування адаптивного середовища, вибір професії, подружньої пари, прогноз дітонародження), так і членів його родини - вчасне виявлення уражених індивідуумів, пренатальна діагностика, профілактичне лікування, прекоцепційна профілактика, ступінь ризику народження хворих дітей.

Вищевикладене дозволяє зробити висновок: діагностика спадкової патології, успішність її лікування та попередження залежить передусім від компетентності, освіченості лікаря, володіння генетичним мисленням більшою мірою, ніж від наявності дорогої апаратури, реактивів, спеціалізованих установ тощо.

Змістовний модуль 2. Цитогенетичні методи діагностики природженої та спадкової патології.

Студент повинен знати:

1. Значення цитогенетичного методу в клінічній практиці: діагностика хромосомних хвороб.
2. Діагностика онкологічних захворювань і деяких видів лейкозів.
3. Оцінка мутагенних ефектів лікарських засобів.
4. Діагностика ряду менделюючих захворювань, пов'язаних з хромосомною нестабільністю.
5. Показання до цитогенетичного аналізу.
6. Методи забору матеріалу для проведення цитогенетичного дослідження.
7. Методика проведення цитогенетичного дослідження.
8. Методи фарбування хромосом.
9. Варіанти цитогенетичних методів дослідження.
10. Сучасні технології дослідження хромосом: прометафазний аналіз.
11. Флуорисцентна гібридизація *in situ*.
12. Авторадіографічне дослідження.
13. Показання до проведення молекулярно-генетичних досліджень.
14. Методика проведення молекулярно-генетичних досліджень.

Тема 5. Цитогенетичні методи дослідження в клініці.

Короткий виклад теоретичного матеріалу:

Впровадження в практику клінічної цитогенетики високочутливих та молекулярно-цитогенетичних методів дало можливість визначити генетичні чинники понад 20 клінічно окреслених нозологічних форм хромосомної патології (ХП) та виділити їх в окрему групу захворювань – синдромів сегментних анеусомій (ССА), які супроводжуються мікроструктурними змінами ділянок певних хромосом (Кулешов, 2001; Иванов, 2004). До групи ССА зараховують синдром Вольфа-Хіршхорна (СВХ), синдром „котячого крику”, синдром Вільямса-Бойрена (СВБ), синдром Прадера-Віллі (СПВ), синдром мікроделеції 22q11.2, синдром „котячого ока” та інші. Більшість ССА зустрічаються рідко (1:50 000 – 1:100 000) (Бочков, 2001; Залетаев, 2001).

Цитогенетичний аналіз дозволяє записувати діагноз спадкового захворювання у вигляді каріотипічної формули.

Цитогенетичний метод (метод хромосомного аналізу) ґрунтується на мікроскопічному дослідженні структури і кількості хромосом. Він набув широкого застосування в 20-х роках ХХ ст., коли було отримано перші відомості про кількість хромосом у людини. У 30-х роках ідентифіковано перших 10 пар хромосом.

У 1956 р. шведські вчені Дж.Тийо і А.Леван вперше довели, у людини 46, а не 48 хромосом.

Цитогенетичний метод використовують для:

- вивчення каріотипів організмів;
- уточнення числа хромосомних наборів, кількості і морфології хромосом для діагностики хромосомних хвороб;
- складання карт хромосом;
- для вивчення геномного і хромосомного мутаційного процесу
- вивчення хромосомного поліморфізму в людських популяціях

Стандартні цитогенетичні методи:

- 1) ФТА - культивування лімфоцитів;
- 2) диференційне забарвлення хромосом - Y.O. R.C.
- 3) NOR - забарвлення ядерце-утворюючих ділянок акроцентричних хромосом.

Хромосомний набір людини містить велику кількість хромосом, основні відомості про які можна отримати при вивченні їх в метафазі мітозу і профазі - метафазі мейозу. Клітини людини для прямого хромосомного аналізу отримують шляхом біопсії кісткового мозку і гонад, або непрямим методом - шляхом культивування клітин периферичної крові (лімфоцити), коли отримують значну кількість метафаз. Непрямим методом досліджують також клітини амніотичної рідини або фібробласти, отримані при амніоцентезі або біопсії хоріона клітини абортусів, мертвонароджених та ін.

Частіше досліджують хромосоми в лімфоцитах периферичної крові із венозної, гепаринізованої крові (10 мл). Через 1 годину відстоювання в холодильнику, відсмоктують плазму, а лейкоцити розміщують у живильне середовище 199 або Ігла у співвідношенні 1:1,5. Для стимуляції мітозу додають фітогемаглютинін з розрахунку 0,1 мл на 10 см³ суміші, а також пеніцилін - 100 ОД на 1 см³ суміші. Культуру у флаконах поміщають у термостат при 37°C на 48 або 72 год. За 6 год до кінця інкубації додають колхіцин з розрахунку 0,5 мкг/мл, який перериває поділ лімфоцитів на стадії метафазі. Потім культуру знову поміщають у термостат на 2-4 год, після чого її зливають в центрифужні пробірки і центрифугують 5 хв при 800-1000 об/хв. Після центрифугування надосадову рідину зливають, а до осаду додають 5 мл гіпотонічного розчину. Використовують 0,95%-ий розчин цитрату натрію або 0,56%-ий розчин калій хлориду підігрітими до 37°C. У цьому розчині клітини витримують 7 хв, коли застосовують калій хлорид, або 15 хв якщо застосують цитрат натрію. Культуру знову центрифугують 5-7 хв за той же швидкості обертів. Перебування культури в гіпотонічному розчині і наступне центрифугування призводить до розриву ядерних оболонок і виходу хромосом у цитоплазму клітин.

Після центрифугування надосадову рідину зливають, а до осаду доливають 1-2 мл фіксатора, який складається із метилового (або етилового) спирту і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Фіксацію проводять не менше 40 хвилин. За цей час фіксатор декілька разів зливають і додають свіжий (3-4 рази), поки клітинна суспензія не стане безбарвною. В останній порції фіксатора клітини суспензують і 3-4 краплі клітинної суспензії наносять на підготовлене предметне скельце. Висушують феном в струмені повітря і забарвлюють ядерними барвниками: 2% розчин ацеторсеїну, азуреозином, барвником Унна, розчином Гімза та ін. Накривають покривним скельцем, видаляють надлишок барвника фільтрувальним папером, розглядають під мікроскопом з масляної імерсіїю.

Останнім часом всі дослідження в цитогенетиці людини проводять із застосуванням методів диференційного забарвлення хромосом; розроблено нові методики забарвлення хромосом, які дозволяють відрізнити кожну хромосомну пару (диференціальне забарвлення хромосом). Існує декілька способів забарвлення: Q, G, C, K. У вирішенні питань діагностики хромосомних хвороб різні методи диференціального забарвлення застосовують у комбінації.

Завдяки диференціальному забарвленню хромосом можна виявити незначні хромосомні поломки: невеликі делеції, транслокації та ін. Хромосомні зміни виявляють, досліджуючи

каріотип дорослого організму, в клітинах амніотичної рідини і в клітинах хоріону для діагностики хромосомних захворювань плода. Важливо відзначити, що при всій різноманітності подібних обробок хромосомних препаратів після фіксації і застосовуваних флуорохромних або нефлуоресціруючих барвників що виявляється лінійна неоднорідність хромосоми завжди одна й та ж. Її малюнок змінюється лише в залежності від ступеня ущільненості хромосоми: в довших, слабкіше скорочених хромосомах стає помітною подальша неоднорідність тих сегментів, які виглядали гомогенно пофарбованими в сильно конденсованих хромосомах. Диференціальне фарбування може спостерігатися або по всій довжині хромосоми (Q-, G-і R-сегменти), або в її центромерном районі (С-сегменти).

Найбільш чітке уявлення про малюнок диференціального фарбування хромосом по всій довжині можна отримати при фарбуванні препаратів по G-методикою, використовуючи барвник Гимзе (рис. 10). На таких препаратах хромосоми виглядають поперечно-смугастих, по-різному пофарбованими сегментами («banding»). Малюнок кожної пари хромосом є специфічним для неї. Розміри сегментів неоднакові. У дрібних хромосомах груп F і G малюнок утворюється одиничними сегментами, у великих хромосомах їх багато. Загальна кількість забарвлених і нефарбованих сегментів в нормальному хромосомному наборі середнього ступеня конденсації, відповідно до Паризької номенклатурою, так само 322. У прометафазних хромосомах їхнє число збільшується до 1000 і більше. Одним із останніх сучасних методів уточнюючої цитогенетичної діагностики є високорозміщуючий молекулярно-цитогенетичний метод, який отримав назву гібридизація *in situ*. Роздільна здатність методу складає 5×10^4 п.о., тому він дозволяє досліджувати хромосомні сегменти довжиною від 5×10^4 (4) до 5×10^6 (6) п.о.

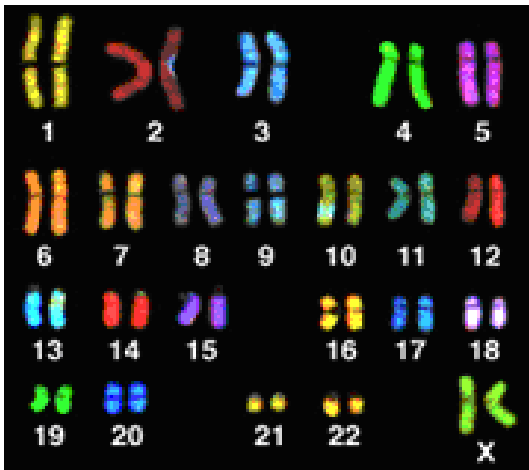
Для хромосоми або її ділянки, що вивчається, синтезують комплементарну послідовність ДНК і приєднують до неї мітку. "Міткою" можуть бути різні речовини, зокрема радіоактивні і флуоресцентні (флуорохроми). "Помічену" послідовність ДНК називають зондом. Зонд "знаходить" комплементарну послідовність в хромосомному наборі і приєднується до неї. Потім надлишок видаляють і проводять визначення сигналу гібридизації.

Відома модифікація цього метода, - флуорисцентна гібридизація. Для проведення Fish зонди різняться не тільки специфічністю по довжині, але і за способом мічення. Метод використовують не тільки для визначення розташування гена, але і для розшифрування складних хромосомних перебудов (уточнення хромосомних фрагментів, виявлення хромосомного мозаїцизму, розташування місць розривів при транслокації та ін.).

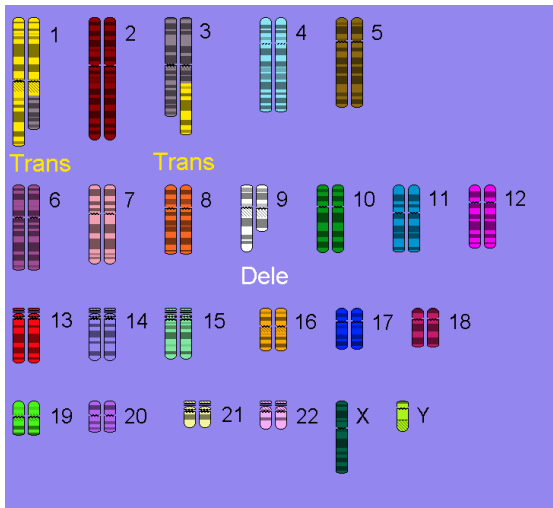
Методу флуоресцентної гібридизації *in situ*

Успіхи молекулярної цитогенетики людини дозволили розробити нові методи вивчення хромосом. Одним з них є метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). Це метод заснований на взаємодії комплементу ДНК об'єкту, що вивчається, з невеликою штучною послідовністю нуклеотидів ДНК, званої ДНК-зондом. ДНК-зонд сполучений з флуоресціруючим речовиною. Взаємодія комплементу ДНК об'єкту, що вивчається, і ДНК-зонда називається гібридизацією ДНК.

Якщо гібридизація відбувається, то ця подія фіксується люмінесцентним мікроскопом і свідчить про наявність в досліджуваному зразку фрагмента ДНК, комплементу ДНК-зонду. За допомогою цього методу, маючи набір різних ДНК-зондів, можна навіть в клітці, що не ділиться, виявити аномалію числа хромосом і наявність патологічного гена, а також виявити дрібні хромосомні мутації, які важко виявити звичайними способами. При цьому різні хромосоми або їх ділянки виглядають як різноколірні структури (мал.1,2)



Мал. 1 Нормальна жіноча кариограма людини, отримана при використанні методики спектрального кариотіпірування .



Мал. 2 Кариограма чоловіка з перенесенням ділянки 1-ої хромосоми на 3-у і втратою ділянки 9-ої хромосоми.

Принцип методу флюоресцентної гібридизації in situ полягає в наступному:

1. Готують одноланцюгову ділянку ДНК хромосоми або її ділянки, яка підлягає дослідженню. До цієї ділянки приєднують мітки - біотваней і діоксигенін.
2. На препараті, використовуваному для мікроскопічного дослідження in situ, проводиться лужна обробка ДНК; під впливом лугу ДНК «розплітається» на дві нитки.
3. До ниток додається ДНК-зонд. Оскільки нитки ДНК взаємокомплементарні (тобто до однієї нуклеотидної пари приєднується строго визначена інша пара), зонд приєднується до відповідної ділянки хромосоми. При цьому відновлюється подвійна спіраль (ренатурація ДНК).
4. Отриманий препарат обробляють хімічними сполуками, які мають хімічну спорідненість з біотіном (такою речовиною для біотвань є стрептовідін) або з діоксигеніном (антідіоксигеніновое антитіло).
5. До отриманих комплексів приєднують далі флюоресцентні фарбники (червоного кольору - родамін або зеленого кольору - ізотіоціанат).
6. Цветная окраска позволяет проводить анализ хромосом с помощью люминисцентного микроскопа довольно отчетливо на фоне неокрашенных хромосом. Количество цветов

может быть увеличено за счет других расцветок, если возникает подобная необходимость (трехцветовая флюоресцентная гибридизация и т.д.).

Тема 6. Хромосомні аномалії (числові, структурні).

Студент повинен знати

1. Типи патологічних змін у каріотипі: порушення числа, структури, плоідності хромосом.
2. Правила запису каріотипу.
3. Мати уявлення про мікроструктурні перебудови в хромосомах.

Короткий виклад теоретичного матеріалу:

Захворювання, зумовлені зміною кількості хромосом (етіологічний фактор - геномні мутації) або структури хромосом (етіологічний фактор - хромосомні мутації). Хромосомними хворобами страждає 0,6-1% новонароджених дітей. До 40% внутрішньоутробних ушкоджень плоду зобов'язане своїм походженням хромосомним хвороб. Прикладом хромосомних аномалій, пов'язаних з чисельним зміною хромосом, є синдром Дауна.

При цьому порушується порядок розташування і змінюється кількість сотень і навіть тисяч генів. У результаті виникають множинні ураження органів і систем організму без певного провідного патогенетичного ланки. В основі морфологічної картини лежать загальнопатологічні процеси: аплазії, дегенерація бластоматоз.

Хромосомні хвороби або синдроми поділяються на 2 групи:

1-а група - хромосомні аномалії та синдроми, пов'язані з аномаліями аутосом, які поділяються на числові та структурні аномалії. До числовим аномалій відносяться синдром Дауна (трисомія по хромосомі 21, синдром Патау (трисомія по хромосомі 13) та ін До структурних аномалій, які зустрічаються рідше, належать синдром Лежена (делеція короткого плеча хромосоми 5), синдроми, обумовлені делецій короткого плеча хромосоми 4 та ін

2-а група - хромосомні синдроми, пов'язані з аномаліями статевих хромосом. Серед них також виділяють числові і структурні аномалії.

До числовим аномалій відносяться синдром Клайнфельтера (синдром ХХУ), синдром Тернера (моносомія хромосоми Х) та ін

До структурних аномалій відносяться різні варіанти синдрому Тернера (ізохромосома довгого плеча хромосоми Х, кільцева хромосома Х) і ін

Хромосомні синдроми рідко передаються у спадщину, вони часто носять одиничний, спорадичний характер в сім'ї, тому що механізм їх виникнення пов'язаний з геномної мутації і нерозходження хромосом у мейозі. Повторне нерасходження хромосом у того ж людини і в тій же парі хромосом має дуже малу ступінь ймовірності. Найчастіше хромосомні аномалії можуть повторюватися в сім'ї і в тому випадку, якщо є структурна перебудова: транслокація, делеція, ізохромосома.

Класифікація спадкової патології може будуватися на клінічних принципах. У цих випадках в основу класифікації кладеться принцип ураження того чи іншого органу або системи, тобто умовно спадкова патологія може класифікуватися по органному принципом, системним принципом і типу обміну речовин: нервові, нервово-м'язові, хвороби опорно-рухової системи, дефекти ліпідного обміну і т.д.

З клінічних позицій подібна класифікація спадкової патології підрозділяється на спадкові хвороби нирок, печінки, нервово-м'язові, психічні, органів дихання, опорно-рухової системи, крові і т.д. або за типами обмінних порушень (виділяють щонайменше 12 класів обмінних розладів - порушення амінокислотного обміну, ліпідів, вуглеводів, обміну пероксисом, вітамінів тощо). Подібна класифікація по суті не відрізняється від клінічної класифікації різної соматичної патології і малопродуктивна щодо спадкової патології, тому що в більшості випадків спадкові хвороби супроводжуються ураженням декількох

органів і систем (наприклад, нейрофіброматоз вражає нервову систему, шкіру, очі, кістково-м'язову систему та ін.), і віднести їх до якої-небудь однієї системи поразки не представляється можливим.

В даний час найбільшою популярністю користується класифікація, заснована на генетичних принципах: виділяють 5 груп хвороб: генні хвороби; хромосомні синдроми; хвороби з спадковим нахилом (мультифакторіальні, багатофакторні хвороби); генетичні хвороби соматичних клітин і хвороби генетичної несумісності матері та плоду.

У кожній групі виділяються підгрупи з урахуванням типу спадкової передачі (аутосомно-домінантні, аутосомно-рецесивні і Х-і Y-зчеплені форми).

Спадкові хвороби зустрічаються в практиці лікаря будь-якої спеціальності. У зв'язку з цим спадкові хвороби не можуть класифікуватися в залежності від медичної спеціальності.

Структура хромосом.

Кожна хромосома складається з хроматину - складного комплексу з ДНК, білків та деяких інших компонентів (зокрема, РНК). Хроматин неоднорідний, і деякі типи такої неоднорідності видно під мікроскопом. Тонка структура хроматину в інтерфазних ядрі, обумовлена характером укладання ДНК та її взаємодії з білками, грає важливу роль в регуляції транскрипції генів і реплікації ДНК і, можливо, клітинної диференціювання.

Послідовності нуклеотидів ДНК, які утворюють гени і служать матрицею для синтезу мРНК, розподілені по всій довжині хромосом (окремі гени, зрозуміло, занадто малі, щоб їх можна було бачити під мікроскопом). До кінця ХХ століття приблизно для 6000 генів було встановлено, на якій хромосомі і в якій ділянці хромосоми вони знаходяться і який характер їх зчеплення (тобто становища один щодо одного).

Неоднорідність метафазних хромосом, як уже згадувалося, можна побачити навіть при світловій мікроскопії. При диференціальному фарбуванні щонайменше в 12 хромосомах виявлені відмінності у ширині деяких смуг між гомологічними хромосомами (рис. 66.3). Такі поліморфні ділянки складаються з некодуючих високоповторяючих послідовностей ДНК.

Методи молекулярної генетики зробили можливою ідентифікацію величезного числа менших за розміром і тому не виявляються при світловій мікроскопії поліморфних ділянок ДНК. Ці ділянки виявляють як поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів, які варіюють за кількістю тандемні повтори і поліморфізм коротких тандемних повторів (моно-, ді-, три- і тетрануклеотидна). Така мінливість фенотипічно зазвичай не виявляється.

Однак поліморфізм служить зручним інструментом пренатальної діагностики завдяки зчепленню певних маркерів з мутантними генами, що викликають захворювання (наприклад, при міопатії Дюшенна), а також при встановленні зиготності близнюків, встановлення батьківства та прогнозування відторгнення трансплантата.

Важко переоцінити значення таких маркерів, особливо широко поширених в геномі високополіморфних коротких тандемних повторів, для картування геному людини. Зокрема, вони дозволяють встановити точний порядок і характер взаємодії локусів, що грають важливу роль у забезпеченні нормального онтогенезу і клітинної диференціювання. Це стосується і тих локусів, мутації в яких приводять до спадкових захворювань.

Помітні під мікроскопом ділянки на короткому плечі акроцентричних аутосом забезпечують синтез рРНК та освіта ядерця, тому їх називають районами ядерцевої організатора. У метафазі вони неконденсовані і не фарбуються. Райони ядерцевої організатора примикають до знаходяться на кінці короткого плеча хромосоми конденсованим ділянках хроматину - супутникам. Супутники не містять генів і є поліморфними ділянками.

У невеликої частини клітин вдається виявити інші деконденсіровані в метафазі ділянки, так звані ламкі ділянки, де можуть відбуватися "повні" розриви хромосоми. Клінічне значення мають порушення в єдиному подібному ділянці, розташованій на кінці довгого плеча X-хромосоми. Такі порушення викликають синдром ламкої X-хромосоми. Інші приклади спеціалізованих районів хромосом - теломери і центромери.

Теломери - це кінцеві райони хромосом, що взаємодіють з ядерною оболонкою; передбачається, що вони беруть участь у підтримці впорядкованої організації інтерфазного ядра і в правильному спарюванні гомологічних хромосом у мейозі.

Центромери - це місця приєднання мікротрубочок веретена в метафазі.

Неоднорідність хромосом виявляється і в асинхронній реплікації їх ділянок в періоді S. У цілому, пізня реплікація характерна для неактивних ділянок.

У жінок одна з двох X-хромосом майже повністю інактивована (за винятком псевдоаутосомного ділянки і декількох додаткових локусів). Інактивована X-хромосома реплікується пізно, в кінці фази S, а в інтерфазі вона конденсувати і помітна під мікроскопом як статевий хроматин, або тільце Барра. Асинхронність реплікації, яка найкраще видно на прикладі X-хромосом, характерна і для окремих ділянок аутосом. Припускають, що в аутосомах така асинхронність пов'язана з геномним імпринтингом.

Поки точно не встановлено роль гетерохроматину, на частку якого припадає значна частина генома людини. Гетерохроматин конденсувати протягом практично всього клітинного циклу, він неактивний і реплікується пізно. Більшість ділянок конденсованих і неактивні у всіх клітинах (конститутивний гетерохроматин), хоча інші, наприклад X-хромосома, можуть бути як конденсованими і неактивними, так і деконденсірованими і активними (факультативний гетерохроматин). Якщо через хромосомних аберацій гени виявляються поряд з гетерохроматином, то активність таких генів може змінюватися або навіть блокуватися. Тому прояви хромосомних аберацій, таких, як дуплікації або делеції, залежать не тільки від порушених локусів, але і від типу хроматину в них. Багато хромосомні аномалії, які не є летальними, зачіпають неактивні або інактивіруємі ділянки геному. Можливо, цим пояснюється, що трисомії за деякими хромосомами або моносомії по X-хромосомі сумісні з життям.

Прояви хромосомної аномалії залежать також від нового розташування структурних та регуляторних генів по відношенню один до одного і до гетерохроматину.

На щастя, багато структурні особливості хромосом вдається надійно виявити цитологічними методами. В даний час існує ряд методів диференціального фарбування хромосом. Розташування і ширина смуг ідентичні в кожній парі гомологічних хромосом, за винятком поліморфних ділянок, тому фарбування можна використовувати в клінічній цитогенетиці для ідентифікації хромосом та виявлення в них структурних порушень.

Каріотип - це сукупність ознак повного набору хромосом соматичних клітин організму на стадії метафазі (III фаза поділу клітини) - їх кількість, розмір, форма, особливості будови. Дослідження каріотипу проводять методом світлової мікроскопії з метою виявлення патології хромосом. Найчастіше це дослідження проводять у дітей для виявлення захворювань, обумовлених порушеннями в хромосомах і в подружжя при безплідді або звичному невиношуванні вагітності. Виявлення хромосомних перебудов в цьому випадку дозволяє встановити причину безпліддя і прогнозувати ризик народження в даній сім'ї дітей з хромосомною патологією.

Поza процесу поділу клітини хромосоми у її ядрі розташовані у вигляді «розпакованої» молекули ДНК, і вони важко доступні для огляду в світловому мікроскопі. Для того, щоб хромосоми і їх структура стало добре видно використовують спеціальні барвники, що дозволяють виявляти гетерогенні (неоднорідні) ділянки хромосом і проводити їх аналіз - визначати каріотип. Хромосоми в світловому мікроскопі на стадії метафазі є молекули ДНК, упаковані за допомогою особливих білків в щільні свержспіралізовані паличкоподібні структури. Таким чином, велика кількість хромосом упаковується в маленький обсяг і міститься у відносно невеликому обсязі ядра клітини.

Розташування хромосом, видиме в мікроскопі, фотографують і з декількох фотографій збирають систематизований каріотип - нумерований набір хромосомних пар гомологічних хромосом. Зображення хромосом при цьому орієнтують вертикально, короткими плечима вгору, а їх нумерацію виробляють в порядку убавання розмірів. Пару статевих хромосом поміщають в самому кінці зображення набору хромосом.

Сучасні методи каріотипування забезпечують детальне виявлення хромосомних аберацій (внутріхромосомних і міжхромосомними перебудов), порушення порядку розташування фрагментів хромосом - делеції, дуплікації, інверсії, транслокації. Таке дослідження каріотипу дозволяє діагностувати ряд хромосомних захворювань, викликаних як грубими порушеннями каріотипів (порушення числа хромосом), так і порушенням хромосомної структури або множинністю клітинних каріотипів в організмі.

Порушення нормального каріотипу у людини виникають на ранніх стадіях розвитку організму. Якщо це відбувається в статевих клітин майбутніх батьків (у процесі гаметогенезу), то каріотип зиготи (див.), що утворилася при злитті батьківських клітин, також виявляється порушеним. При подальшому розподілі такої зиготи всі клітини ембріона і розвинувся з нього організм виявляться з однаково аномальним каріотипом. Проте, порушення каріотипу можуть виникнути і на ранніх стадіях дроблення зиготи. Розвинувся з такої зиготи організм містить кілька ліній клітин (клітинних клонів) із різними каріотипу. Таке різноманіття каріотипів у всьому організмі або тільки в деяких його органах називають мозаїцизм.

Як правило, порушення каріотипу у людини супроводжуються різними, в тому числі комплексними, вадами розвитку, і більшість таких аномалій несумісне з життям. Це призводить до мимовільних абортів на ранніх стадіях вагітності. Однак досить велика кількість плодів (~ 2,5%) з аномальним каріотипом доношують до закінчення вагітності.

Нижче представлені захворювання, обумовлені порушеннями в каріотипі.

47, XXУ; 48, XXXУ Синдром Клайнфельтера

полісомія по Х-хромосомі у чоловіків 45X0; 45X0/46XX;

45, X/46, XY, 46 a, X iso (Xq) Синдром Шерешевського – Тернера

моносомія по Х-хромосомі, в т. ч. і мозаїцизм 47, ХХХ; 48, ХХХХ;

49, ХХХХХ полісомії по Х хромосомі Найбільш часто - трисомія Х

47, ХХ, +21; 47, ХУ, +21 Хвороба Дауна Трисомія по 21-й хромосомі

47, ХХ, +18; 47, ХУ, +18 Синдром Едвардса Трисомія по 18-й хромосомі

47, ХХ, +13; 47, ХУ, +13 Синдром Патау Трисомія по 13-й хромосомі

46, ХХ, 5p-Синдром котячого крику Делеція короткого плеча 5-ї хромосоми . При описі аномального каріотипу використовують додаткові символи, що вказують тип і характер хромосомної перебудови. У разі чисельних аномалій хромосом (поліплоїдії) першим наводиться загальна кількість хромосом, кратне гаплоїдному. Наприклад, тріплоїдні каріотип записується так: 69, ХХУ або 69, ХХХ.

При наявності анеуплоїдій по аутосомам після вказівки загальної кількості хромосом і статі людини ставиться знак «+» при збільшенні кількості хромосом в одній парі або знак «-» при зменшенні. Наприклад, трисомія по 15 хромосомі у чоловіка записується як: 47, ХУ, +18, а моносомія по 13 хромосомі в жіночому каріотипі записується як 45, ХХ, -13. Нагадаємо, що повна моносомія з будь-якої аутосоми легальна і може визначатися тільки у абортусів і мертвороджених.

Дещо по-іншому записуються кількісні перебудови, що зачіпають статеві хромосоми. Якщо відбулося збільшення або зменшення числа статевих хромосом, то знак «+» або «-» не ставиться, а просто записуються їхні символи в необхідній кількості. Наведемо деякі приклади запису кількісних аномалій статевих хромосом:

45, Х0 - моносомія по Х-хромосомі (синдром Шерешевського-Тернера)

47, ХХХ - трисомія по Х-хромосомі у жінки

47, ХХУ - каріотип з додатковою Х-хромосоною у чоловіка (синдром Клайнфельтера).

При описі структурних аномалій спочатку, як і при описі нормального каріотипу, вказується загальна кількість хромосом, потім - набір статевих хромосом, що визначають стать обстеженого, після чого ставиться кома і приводиться опис характеру структурної перебудови: делеція позначається del, інверсія-inv, дуплікація - dup, транслокація -t, кільцева хромосома - r, інсерцій - ins. Після цього, в дужках, вказується номер хромосоми - 46, XY, del (2), а при міжхромосомними обмінах - номери хромосом, залучених до перебудову.

Якщо у розбудову були залучені дві хромосоми (і більше), то для відділення їх один від одного ставиться крапка з комою і першою записується хромосома, що має менший номер. У тому випадку, якщо вдається ідентифікувати сегменти, підсегменти і смуги хромосом, в яких відбулися розриви, то вони вказуються в наступних дужках. Так, наприклад, запис 46, XY, del (2) (2q 14.1) означає, що мова йде про розрив у першій субодиноці четвертого сегмента першої смуги довгого плеча другої хромосоми. Приклади запису структурних перебудов хромосом наведені в таблиці.

Хромосомні перебудови можуть виявлятися у всіх клітинах організму (повна форма хромосомного синдрому) або в певному клоні клітин (мозаїчна форма). Повні форми хромосомних аномалій можуть бути успадковані від батьків, за наявності носійства ними хромосомної перебудови або виникати de novo в одній єдиній гамете, що дала початок новому організму. Поява мозаїцизму обумовлено виникненням мутацій у зиготі, сформованої нормальними гаметами в процесі клітинного ділення у внутрішньоутробному періоді.

При виявленні мозаїцизму позначення каріотипів різних клітинних клонів поділяються косою рисою (/). Наприклад, запис каріотипу 45, X/47, XXX (50% / 50%) означає, що при цитогенетичним дослідженні препарату виявлено два клону клітин - один з моносомією по X-хромосомі, а інший з трисомією по X-хромосомі, в співвідношенні 1 : 1. Згідно з вимогами сучасної номенклатури в кінці запису в квадратних дужках повинні бути зазначені абсолютні кількості клітин в клоні кожного типу, виявлені при цитогенетичним дослідженні.

Плоїдність - число наборів хромосом, що знаходяться в ядрі клітини або в ядрах клітин багатоклітинного організму.

Іноді цей термін застосовують і щодо прокаріотичних клітин, позбавлених ядра. Більшість прокаріотів гаплоїдний, тобто мають одну копію бактеріальної хромосоми, однак зустрічаються диплоїдні і поліплоїдні бактерії.

Розрізняють клітини гаплоїдні (з одинарним набором непарних хромосом), диплоїдні (з парними хромосомами), поліплоїдні (їх нерідко називають, залежно від того, скільки разів в ядрі клітини повторюється гаплоїдний набір, конкретно трі-, тетра-, гексаплоїдними і т. д.) та анеуплоїдні (коли подвоєння або втрата - нулісомія - охоплює не весь геном, а лише обмежене число хромосом). Поліплоїдія (збільшення числа хромосом в ядрі клітки, кратне гаплоїдному набору) не слід плутати із збільшенням кількості ядер в клітині і збільшенням кількості молекул ДНК в хромосомі

Чергування гаплоїдної і диплоїдної фаз в життєвому циклі

У нормі у більшості організмів, для яких відомий статевий процес, в життєвому циклі відбувається правильне чергування гаплоїдної і диплоїдної фаз. Гаплоїдні клітини утворюються в результаті мейотичного поділу диплоїдних клітин, після чого у деяких організмів (рослини, водорості, гриби) вони можуть розмножуватися за допомогою мітотичних поділів з утворенням гаплоїдного багатоклітинного тіла або декількох поколінь гаплоїдних клітин-нащадків. Диплоїдні клітини утворюються з гаплоїдних в результаті статевого процесу (злиття статевих кліток, або гамет) з утворенням зиготи, після чого можуть розмножуватися за допомогою мітотичних поділів (у рослин, водоростей і деяких інших протистів, тварин) з утворенням диплоїдного багатоклітинного тіла або диплоїдних клітин-нащадків.

Порушення плоїдності у людини

У людини, як і у переважної більшості багатоклітинних тварин, велика частина кліток диплоїдні. Гаплоїдні тільки зрілі статеві клітки, або гамети. Порушення плідності (як анеуплоїдія, так і більш рідкісна поліплоїдія) приводять до серйозних хвороб. Приклади анеуплоїдії у людини: синдром Дауна - трисомія по 21-й хромосомі (21-а хромосома представлена трьома копіями), синдром Кляйнфельтера - надмірна X хромосома (XXY), синдром Тернера - нулісомія по одній з статевих хромосом (XO). Описано також трисомія по X хромосомі і випадки трисомії по деяких інших аутосомам (крім 21-й). Приклади поліплоїдії рідкісні, проте відомі як абортивні тріплоїдні зародки, так і тріплоїдні новонароджені.

Тема 7: Хромосомний поліморфізм, хромосомна нестабільність, гонадний мозаїцизм, одно батьківська дисомія

Студент повинен знати:

1. Мати уявлення про хромосомний поліморфізм.
2. Правила запису хромосомного поліморфізму.
3. Мати уявлення про хромосомну нестабільність.
4. Поняття про гонадний мозаїцизм.
5. Методи дослідження гонадного мозаїцизму.
6. Мати уявлення про явище одно батьківської дисомії.

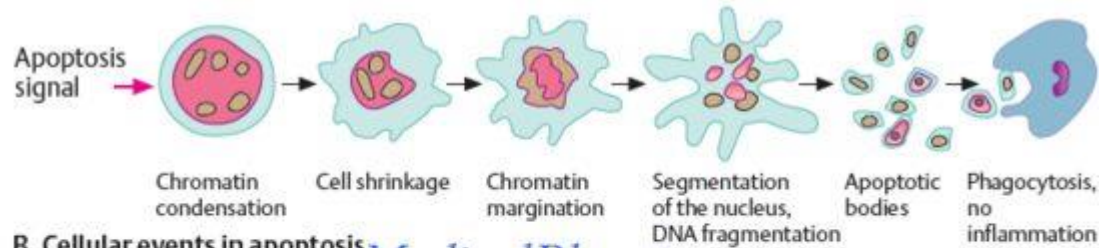
Короткий виклад теоретичного матеріалу

Поліморфізм хромосомний - одночасна наявність в популяції двох або кількох морфологічних варіантів хромосом, причому поширеність самого рідкісного варіанту перевершує рівень спонтанного виникнення повторних хромосомних мутацій.

Для запису нормального каріотипу людини, а також для позначення структурних і кількісних перебудов хромосом використовується певна універсальна схема і спеціальні символи. Запис каріотипу починають з загальної кількості хромосом у клітині, після чого ставиться кома і позначається набір статевих хромосом, який вказує на стать обстеженого. Наприклад, запис 46, XX характеризує нормальний каріотип жінки, а 46, XY - нормальний каріотип чоловіка. Якщо хромосомних перебудов у обстеженого не виявлено, то запис на цьому закінчується.

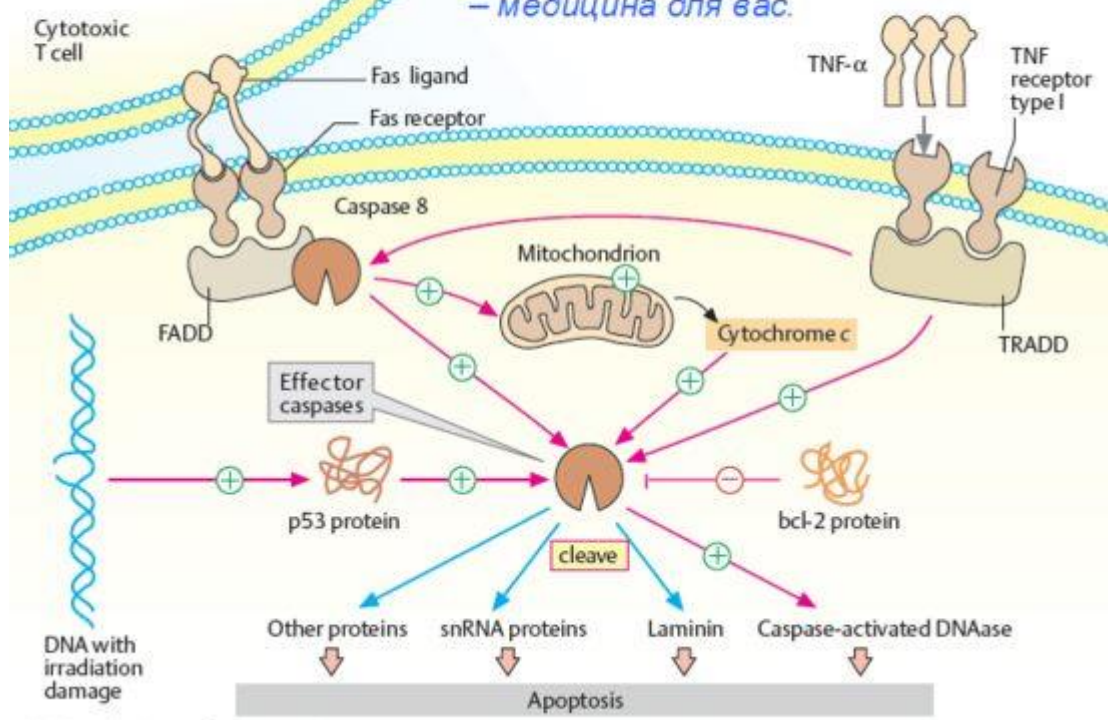
У ряді випадків, при обстеженні виявляють, так званий, нормальний поліморфізм хромосом - індивідуальні особливості їх будови. Поліморфізм найбільш характерний для акроцентричних хромосом і, як правило, відображає варіабельність розмірів гетерохроматинових сегментів, наявність супутників і спутнічних ниток в області коротких плечей і їх величину. Іноді як варіантів нормального каріотипу розглядають наявність ламких сайтів хромосом, які найчастіше зустрічаються при культивуванні в певному середовищі. У більшості випадків наявність поліморфізму будови хромосом не призводить до виникнення патологічних

СИМПТОМІВ.



B. Cellular events in apoptosis

MedicalPlanet.su
— медицина для вас.



C. Regulation of apoptosis

Відсутність патологічних наслідків при збільшенні розмірів гетерохроматинових блоків хромосом можна пояснити особливістю будови гетерохроматину. Показано, що в його структуру входить ДНК з багаторазово повторюваними послідовностями, кількісні зміни якої не призводять до суттєвого генному дисбалансу. Крім того, вважається, що Некодуюча сателітна ДНК гетерохроматинових районів деяких хромосом може сприяти підвищенню рівня функціонування геному.

Необхідно відзначити, що іноді наявність нормального поліморфізму хромосом, все-таки збільшує ризик народження дитини з хромосомними аномаліями.

Існують дані, що свідчать про те, що серед подружніх пар, у яких спостерігалось народження дітей з вадами розвитку, а також які страждають на безпліддя і звичним невиношуванням вагітності, статистично значимо частіше виявляється носійство хромосом з великими гетерохроматиновими блоками. Переважання осіб зі збільшеними в розмірі гетерохроматиновими сегментами в акроцентричних хромосомах, а також хромосомах 1,9 і 16, відзначено в групі дітей з множинними вродженими вадами розвитку нез'ясованої етіології і олігофренію.

Досить часто в популяції здорових людей при цитогенетичним аналізі виявляється помітне збільшення коротких плечей деяких хромосом (наприклад, хромосоми 15). Вивчення нормального поліморфізму хромосом може мати значення для визначення батьківського походження хромосомної перебудови. Якщо встановлено, від кого з батьків

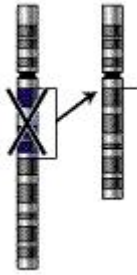
успадкований поліморфізм хромосом, то це вказується при записі каріотипу. Наприклад, запис 46, XX, 15ps + pat означає, що жінка від батька успадковані збільшені супутники на хромосомі 15.

Хромосомні аберації (хромосомні мутації, хромосомні перебудови) - зміни структури хромосом. Класифікують :

- делеції (видалення ділянки хромосоми),
- інверсії (зміна порядку генів ділянки хромосоми на зворотний),
- дуплікації (повторення ділянки хромосоми),
- транслокації (перенесення ділянки хромосоми на іншу).

Хромосомні перебудови носять, як правило, патологічний характер і нерідко призводять до загибелі організму.]

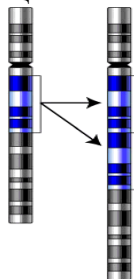
Делеція:



Розрізняють термінальні (втрата кінцевої ділянки хромосоми) і інтеркалярні (втрата ділянки на внутрішній ділянці хромосоми) делеції. Якщо після утворення делеції хромосома зберегла центромеру, вона аналогічно до інших хромосом передається при розподілі, ділянки ж без центромери як правило втрачаються. При зв'язуванні гомологів під час кросинговеру у нормальної хромосоми на місці делеції в мутованій хромосомі утворюється т. н. делеційна петля, яка компенсує відсутність делетированої ділянки.

Досліджені делеції рідко захоплює довгі ділянки хромосом, зазвичай такі аберації летальні. Самим добре вивченим захворюванням, обумовленим делеціями, є синдром котячого крику, описаний в 1963 році Джеромом Леженом. У його основі лежить делеція невеликої ділянки короткого плеча 5 хромосоми. Для хворих характерний ряд відхилень від норми: порушення функцій серцево-судинної, травної систем, недорозвинення гортані (з характерним криком, що нагадує котяче нявкання), загальне відставання розвитку, розумова відсталість, лунообразное обличчя з широко розставленими очима. Синдром зустрічається у 1 новонародженого з 50000. Іншою цікавинкою делецій є делеція в гені, що кодує рецептор CCR5. Цей рецептор використовується вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) для розпізнавання своєї мети - Т-лімфоцитів. Продукт гена з делецією отримав назву CCR5-Δ32, цей варіант CCR5 не пізнається ВІЛ, і носії такої мутації до ВІЛ несприйнятливі (це близько 10% європейців).

Дублікація:



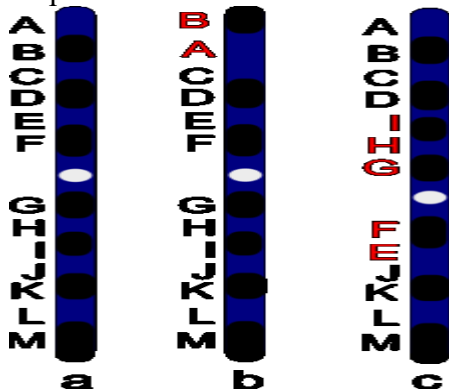
Дуплікації з'являються в результаті нерівного кросинговеру (у цьому випадку другий гомолог несе делеція) або в результаті помилки в ході реплікації. При зв'язуванні хромосоми з дуплікацією і нормальної хромосоми як і при делеції формується компенсаційна петля.

Практично у всіх організмів в нормі спостерігається множинність генів, що кодують рРНК (рибосомальної РНК). Це явище назвали надмірністю генів. Так у *E. coli* на рДНК (ДНК, кодує рРНК) припадає 0,4% всього геному, що відповідає 5-10 копій рибосомальних генів.

Інший приклад дуплікації - мутація *Var* у *Drosophila*, виявлена в 20-х роках ХХ століття Т. Морганом і А. Стертевантом. Мутація обумовлена дуплікацією локусу 57.0 X-хромосоми. У нормальних самок ($B + / B +$) очей має 800 фасеток, в гетерозиготних самок ($B + / B$) очей має 350 фасеток, у гомозигот по мутації (B / B) - всього 70 фасеток. Виявлені також самки з тричі повтореним геном - *double Var* ($BD / B +$).

У 1970 році Сусумі Воно в монографії «Еволюція шляхом дуплікації генів» розробив гіпотезу про еволюційної ролі дуплікацій, що постачають нові гени, не зачіпаючи при цьому функцій вихідних генів. На користь цієї ідеї говорить близькість ряду генів по нуклеотидного складу, що кодують різні продукти. Це трипсин і хемотрипсин, гемоглобін і міоглобін і ряд інших білків.

Інверсія:

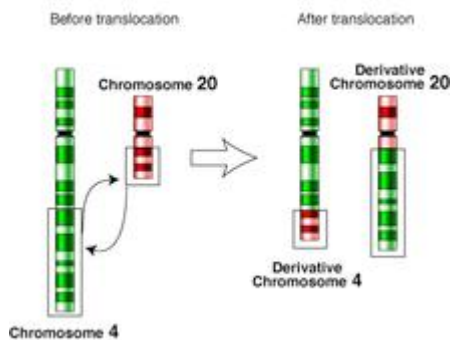


Інверсія. а - нормальна хромосома, b - парацентрической інверсія, с - періцентрическая інверсія.

Розрізняють парацентричну (інвертований фрагмент лежить по один бік від центромери) і періцентричну (інвертований фрагмент лежить по різні сторони від центромери) інверсії. При інверсіях не відбувається втрати генетичного матеріалу, тому як такі інверсії як правило не впливають на фенотип, але якщо в інверсійної гетерозиготі (тобто організмі, що несе як нормальну хромосому, так і хромосому з інверсією) відбувається кросинговер, то існує ймовірність формування аномальних хроматид. У разі парацентричної інверсії утворюється одна нормальна і одна інвертована (фенотипічно нормальна) хроматиди, діцентрична хроматида з дуплікацією її ділянок (при розбіжності хроматид вона зазвичай розривається на дві) і ацентрична хроматида з дуплікацією її ділянок (зазвичай втрачається). У разі періцентричної інверсії утворюється одна нормальна і одна інвертована хроматиди, а також дві хроматиди з дуплікацією її ділянок. Гамети, несучі дефектні хромосоми, звичайно не розвиваються або гинуть на ранніх етапах. Але гамети з інвертованою хромосомою розвиваються в організми, 50% гамет яких нежиттєздатні. Т.ч. мутація зберігається в популяції.

У людини найбільш поширеною є інверсія в 9 хромосомі, не шкодить носію, хоча існують дані, що у жінок з цією мутацією існує 30% вірогідність викидня.

Транслокація:



Реципрокна транслокація 4 і 20 хромосоми у людини.

Крім переміщення ділянок з однієї не гомологічної хромосоми на іншу, класифікують також реципрокні транслокації (коли дві не гомологічні хромосоми обмінюються ділянками), робертсонівські транслокації (при цьому дві не гомологічні хромосоми об'єднуються в одну), а також транспозиції (перенесення ділянки хромосоми на інше місце на тій же хромосомі). Транслокація, реципрокна транслокація і транспозиція, які не супроводжуються втратою генетичного матеріалу (збалансовані транслокації), часто не виявляються фенотипічно. Однак, як і у випадку з інверсіями, в процесі гаметогенезу частина сформованих гамет несе летальні перебудови. Наприклад, у разі реципрокної транслокації зазвичай виживає не більше 50% зигот. Прикладом транслокації може служити "сімейний" синдром Дауна. При цьому захворюванні у одного з батьків виявляється фенотипічно не виявляються транслокація 21-ої хромосоми на 14-у. У такої людини з вірогідністю в 1 / 4 утворюються гамети з двома 21 хромосомами (одна вільна і одна транслоцирована). При злитті такої гамети з нормальною утворюється трисомія по 21 хромосомі.

Інший приклад - транслокація типу "Філадельфійська транслокація" між дев'ятою і двадцять другою хромосомами. У 95% випадків саме ця мутація є причиною однієї з форм хронічної лейкемії (chronic myelogenous leukemia).

Методи вивчення хромосомних перебудов

Хромосомні аберації (ХА) вивчаються на стадії метафази (метафазних метод), а так само на стадіях анафази і телофази (ана-телофазний метод). Ці методи дозволяють виявляти мутагенну активність того чи іншого чинника, оцінити ступінь мутагенної активності фактора, силу впливу різних його доз, визначити мінімальну діючу дозу, визначити залежність доза-ефект.

Метафазних метод є найбільш точним, так як він дозволяє реєструвати велика кількість типів аберацій, визначає тип перебудови і в якій саме хромосомі вона сталася. Але цей метод придатний лише для об'єктів, для яких вже ідентифіковані всі хромосоми, визначений каріотип. Метафазних аналіз більш складний і вимагає високої кваліфікації дослідника. Цей метод використовується, наприклад, для діагностики хромосомних хвороб людини.

Ана-телофазний аналіз простий, економічний, не вимагає знання каріотипу та ідентифікації типів пошкоджень хромосом. Він дозволяє реєструвати менше типів аберацій, але його чутливість цілком достатня для укладання "мутагенів" або "не мутагенів" фактор [1].

Мозаїцизм (генетичний мозаїцизм, хромосомний мозаїцизм - mosaicism; мозаїчність; можуть вживатися синоніми «мозаїчна форма», «мозаїчний каріотип») - від фр. mosaïque «мозаїка» - наявність в тканинах (рослини, тварини, людини) генетично різних клітин.

Слід відрізнити мозаїцизм від хімеризму, при якому два (або більш) генотипу відбуваються більш ніж від однієї зиготи. Поняття мозаїцизму пов'язано з поняттями трисомії і анеуплоїдії.

Може виникати в результаті:

- перерозподілу (кросинговер) в соматичних клітинах,

- соматичних мутацій в зиготі або на ранніх стадіях дроблення;
- неправильної розбіжності (сегрегації) хромосом при поділі клітинного ядра (мітозі).

Діагностика:

Для діагностики мозаїцизму досліджують каріотип крові або клітин тканини - потрібна більша кількість клітин, ніж при діагностиці повних форм, тому що частина клітин будуть демонструвати звичайний каріотип.

Це слід враховувати при пренатальній діагностиці генетичних аномалій плоду, наприклад, при таких аналізах плоду як біопсія хоріона (можна проводити на ранніх термінах вагітності).

Наслідки :

З хромосомним мозаїцизмом пов'язані деякі генетичні хвороби людини, зазвичай трисомії: так, мозаїчну форму можуть мати синдром Дауна (близько 2%), синдром Клайнфельтера (Клайнфельтера, Кляйнфельтера), синдром Шерешевського - Тернера (20-50% хворих), синдром Едвардса (близько 10%), синдром де ла Шапелл; при цьому, як правило, частина клітин характеризується звичайним набором хромосом, а частина клітин - наявністю дефектної хромосоми.

Мозаїцизм за статевими хромосомами (XX / XY) у ряді випадків призводить до істинного гермафродитизму.

З мозаїчними формами генних хвороб не слід плутати мозаїцизм гонад. Мозаїцизм гонад є окремим випадком органного мозаїцизму, що виникає на більш пізніх стадіях ембріонального розвитку в процесі органогенезу. Наявність його у клінічно здорового індивіда може зумовити народження дітей з повною формою домінантною спадковою хвороби (наприклад, гемофілії)

Мозаїцизм це існування в межах одного організму генетично різних клітин. Мозаїцизм може бути наслідком соматичних мутацій, мітотичного кросинговеру або порушень сегрегації хромосом в мітозі.

Хромосомні аберації і мутації поодиноких генів можуть локалізуватися не у всіх клітинах організму, а тільки в окремих клітинах або клітинних популяціях. Якщо мутації виникають тільки в первинних статевих клітинах, говорять про гонадний мозаїцизм.

Інактивація X-хромосоми відбувається на самих ранніх стадіях ембріогенезу і забезпечує компенсацію дози гена для більшості генів, локалізованих на X-хромосомі. У жінок, гетерозиготних за аллелям X-хромосоми, має місце "фізіологічний мозаїцизм": експресія всіх генів, локалізованих на X-хромосомі, характеризується мозаїчністю (виключаючи гени, які не піддалися інактивації).

Хромосомний мозаїцизм дуже часто зустрічається у хворих з аномаліями статевих хромосом. Як правило, клінічна картина при мозаїцизмі виражена не так яскраво, як в осіб з повною формою хвороби. Ознаки хромосомного мозаїцизму: асиметрія тулуба чи кінцівок, нерівномірна пігментація шкіри. Ці ознаки найбільш характерні для хворих з мозаїцизмом з X-аутосомними транслокаціями. Для підтвердження діагнозу мозаїцизму досліджують культури фібробластів хворих. Мозаїцизм у матері може впливати на розвиток плоду. Наприклад, деякі випадки внутрішньоутробної затримки розвитку плоду з нормальним каріотипом обумовлені частковим мозаїцизмом плаценти.

У хворих з мозаїцизмом з мутацією гена одиночного може спостерігатися неоднорідний розподіл дефекту (приклад - вогнищевий або сегментарний нейрофіброматоз). Якщо мутація домінантного гена відбувається в одному з клонів первинних статевих клітин батьків (гонадний мозаїцизм), то вона може проявитися у дитини. Цим пояснюються деякі випадки народження дітей з моногенними хворобами від здорових батьків.

Одно батьківська дисомія виникає, якщо обидві гомологічні хромосоми або одна хромосома і частина її гомолога успадковуються від одного батька. Іноді одно батьківська дисомія несприятливо впливає на розвиток організму, чому сприяє геномний імпринтинг.

У тих випадках, одно батьківської дисомії коли обидві хромосоми ідентичні, майже будь-який мутантний рецесивний алель може викликати захворювання внаслідок гомозиготності хворого за всіма генам дисомної хромосоми. При цьому батько, від якого успадковані обидві хромосоми, найімовірніше гетерозиготний за цими генам і тому здоровий.

Змістовий модуль 3. Біохімічні методи діагностики природженої та спадкової патології.

Конкретні цілі:

- Засвоїти принципи організації скринуючих програм.
- Визначити критерії для проведення масового та селективного скринінгу при спадкових хворобах обміну речовин (СХО).
- Засвоїти базові методи дослідження при підозрі на СХО.
- Пояснити показання для проведення тонкошарової хроматографії (ТШХ) амінокислот і вуглеводів крові та сечі.
- Інтерпретувати результати тонкошарової хроматографії амінокислот і вуглеводів крові та сечі.
- Проілюструвати прикладами значення біохімічних досліджень в уточненні діагнозу СХО.
- Пояснити показання для проведення високоякісної рідинної хроматографії амінокислот крові та сечі (метод Pico Tag).
- Пояснити показання для проведення тандемної мас-спектрометрії (МС).
- Порівняти ефективність методів ТШХ, Pico Tag, МС.
- Запропонувати схеми та алгоритми обстеження хворих з підозрою на СХО амінокислот, вуглеводів, сполучної тканини, органічні ацидурії.
- Пояснити показання для проведення загальних метаболічних скринінг-тестів сечі.
- Інтерпретувати результати загальних метаболічних скринінг-тестів сечі.
- Пояснити механізми виникнення гострих метаболічних порушень в неонатальному періоді.
- Пояснити показання для проведення аналізу органічних кислот.
- Пояснити показання для дослідження обміну сполучної тканини.
- Інтерпретувати результати дослідження обміну сполучної тканини.
- Пояснити механізми виникнення кетоза та лактоацидоза у хворих з органічними ацидуріями.
- Пояснити клінічне значення скринуючих програм в ранній діагностиці СХО.
- Запропонувати програму біохімічної діагностики СХО з гострим перебігом.
- Пояснити значення рутинних біохімічних досліджень у діагностиці СХО.
- Пояснити механізми запуску метаболічної декомпенсації у хворих зі СХО.
- Пояснити механізми виникнення гіпоглікемії у хворих з органічними ацидуріями.
- Засвоїти базові методи дослідження при порушенні обміну жирних кислот.
- Знати критерії відбору груп високого генетичного ризику по розвитку СХО.

Тема 8. Діагностика спадкових хвороб обміну речовин.

На межі тисячоліть відбулася епохальна подія: розшифрування молекули спадковості людини – подвійної спіралі ДНК. Вперше людський розум проник у саму глибину живої природи – структуру спадкового апарату, в якому зосереджена не лише програма індивідуального розвитку людини, а й історія всього людства. На думку багатьох вчених, нове століття – це вік генетики – науки про спадковість та мінливість, а тому, важливим напрямком сучасної медицини є молекулярна медицина, з якісними відмінностями від традиційної, з можливістю розшифрування молекулярних основ

етіопатогенезу багатьох нозологій, попередження їх розвитку та розробки індивідуальної фармакотерапії.

Еволюція захворюваності й смертності дітей характеризується зниженням росту інфекційних хвороб та виходом на перший план вродженої, спадкової патології. Зростання даної патології зумовлено досягненнями фундаментальних наук, з одного боку, та, з іншого, факторами зовнішнього і внутрішнього середовища, які мають мутагенні та тератогенні впливи і, тим самим, сприяють виникненню вродженої та спадкової патології у дитини.

На сьогодні генетично детермінована патологія людини, а саме спадкові захворювання обміну речовин (метаболічні хвороби) займають одне з визначних місць. Обмін речовин у організмі людини забезпечується величезною кількістю послідовних етапів, які регулюються ферментами. Ферменти кодуються генами. В нормі ці гени забезпечують можливість ферментних систем ефективно працювати, однак в процесі еволюції, з погіршенням умов зовнішнього і внутрішнього середовища, в геномі людини відбуваються різноманітні мутації (порушення спадкової інформації), які спричиняють розвиток спадкової патології.

Більшість метаболічних порушень є результатом вродженої недостатності визначеного ферменту, викликаної генетичним блоком. Зниження або відсутність функціональної активності того чи іншого ферменту зумовлюють збої біохімічних реакцій в організмі, що призводять до накопичення одних проміжних продуктів, утворення нових метаболітів та дефіциту інших – кінцевих продуктів, і тим самим спричиняють розвиток патологічного процесу.

Основні клінічні ознаки метаболічних порушень спадкового характеру вже починають яскраво проявлятися з неонатального періоду (після народження дитини). Однак, спотворення метаболічних процесів розпочинається ще внутрішньоутробно, і результати порушеного метаболізму плода, впливаючи на стан здоров'я вагітної, зумовлюють особливості акушерського анамнезу, перебіг даної вагітності. Наявність у вагітної багаторазового блювання, ознак порушення функції печінки, гемолізу, тромбоцитопенії, багатовіддя, а також несприятливого перебігу попередніх вагітностей - спонтанний аборт або мертвонародження, можуть бути першими важливими ознаками розвитку патологічного процесу.

На превеликий жаль, метаболічні хвороби не мають специфічних клінічних проявів, а тому часто перебігають під маскою інших захворювань – сепсис, вроджені вади серця, гепатит, неврологічні порушення. Варто зазначити, що в одних випадках перші прояви спадкових порушень обміну речовин вже розпочинаються з моменту народження дитини у вигляді диспепсичних розладів (здуття живота, зниження апетиту, відмова від годування, колики, часті, рідкі випорожнення, відсутня позитивна динаміка маси), тривалої жовтяниці, збільшення розмірів печінки, селезінки, неврологічної симптоматики у вигляді судомного синдрому, пригнічення, порушення м'язового тону. В неонатальному періоді вже можна звернути увагу на дизморфічні риси обличчя немовляти, специфічність зовнішнього вигляду (синдром Гурлер, Рефсума, Цельвегера, Сміта-Лемлі-Опитца, хвороба Тея-Сакса), а також на ранню появу інтоксикаційного синдрому, внаслідок накопичення проміжних продуктів обміну, метаболітів.

Особливістю деяких метаболічних захворювань є наявність так званого «світлого проміжку», тобто безсимптомного періоду, коли типових специфічних ознак не має. Тривалий час такі діти знаходяться під спостереженням у дитячих неврологів з діагнозом «перинатальна енцефалопатія». Однак, чим більше вникати у глибину метаболічних таємниць, тим більше з'являється ознак, що відображають "помилки" обміну, які необхідно своєчасно виявити й адекватно оцінити. Дозволяють запідозрити метаболічні порушення в ранньому віці такі ознаки, як незвичайний запах видихуваного повітря, своєрідний та незвичний запах тіла, сечі, а також колір сечі, зміни з боку шкіри (попрілості, товста шкіра, пігментація), гірсутизм, пристрасть або відраза до окремих

продуктів. Встановлено, що високий рівень споживання білків або прискорений білковий катаболізм ініціюють прояви аміноацидопатій, органічних ацидури, дефекти циклу сечовини; значне вуглеводне навантаження впливає на реалізацію мітохондріопатій; споживання великої кількості фруктів реалізує непереносимість фруктози; молочних продуктів – галактоземії; значне жировенанвантаження призводить до маніфестації порушень окислення жирних кислот; зловживання ліками впливає на маніфестацію порфірії, недостатності глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогенази, порушень окислення жирних кислот; зловживання фізичними навантаженнями ініціює гемолітичний криз при прихованій мітохондропатії. Тригерними факторами запуску метаболічних кризів при спадкових порушеннях обміну речовин (білкового, вуглеводного, біоенергетичного) можуть бути: інфекції, оперативні втручання, голодування, травми, стреси.

Труднощі своєчасної діагностики метаболічних захворювань можуть бути пов'язані з деякими обставинами: клінічний прояв однієї і тієї ж патології варіює навіть в межах сім'ї; різна експресія патологічного гену при однакових мутаціях; різний ступінь пенетрантності супроводжується клінічним поліморфізмом; особливості перебігу неонатального періоду у вигляді сепсису, пологової травми; наростання неврологічної симптоматики, затримка психомоторного розвитку при динамічному спостереженні, ознаки метаболічного кризу на фоні інτερкурентної інфекції.

Батьки хлопчика Х., 1 рік життя, вперше звернулися в обласну дитячу поліклініку зі скаргами на відставання дитини в розумовому розвитку. Дитина не стоїть, не ходить, не говорить, періодично з'являються судоми. З анамнезу відомо, дитина народилася від III вагітності, III пологів, з масою 3900 г, зростом 52 см. На грудному годуванні. Старші діти здорові. З генетичного анамнезу – батьки дитини знаходяться в кровному шлюбі (троюрідні брат і сестра). При огляді – малі розміри голови (мікроцефалія), деформація та низьке розміщення вušних раковин. Хлопчик не стоїть, не ходить, не розмовляє, в контакт не вступає. Спостерігався у невролога з приводу дитячого церебрального паралічу, атонічно-астенічної форми, затримки психомоторного розвитку. Оглянута лікарем-генетиком, запідозрено фенілкетонурію. Після проведення відповідних генетичних тестів діагноз підтверджено. Дитині призначено відповідне лікування, вона знаходиться на обліку в медико-генетичному центрі, однак, позитивної динаміки в його розвитку не має, що свідчить про пізнє виявлення й діагностику даної патології.

Пізня діагностика спадкових порушень обміну речовин призводить до повної маніфестації метаболічних захворювань та інвалідизації, тоді як рання діагностика за допомогою генетичних методів і сучасних технологій, дає можливість проводити своєчасне та ефективне лікування – патогенетичну терапію, яка направляє метаболізм в потрібне русло. Зважаючи на весь трагізм даної патології, зростання показників дитячої інвалідності необхідним є активізація програми початкового метаболічного скринінгу з метою ранньої діагностики спадкових порушень обміну речовин в неонатальному періоді. На превеликий жаль, на сьогодні в Україні проводиться скринінг лише фенілкетонурії і гіпотиреозу.

Тема 9. Масові скринуючі програми в ранній діагностиці спадкової патології.

Масове дослідження немовлят на спадкові хвороби обміну (СХО), поряд із пренатальною діагностикою і медико-генетичним консультуванням, є основою профілактики спадкових хвороб у суспільстві людей. За визначенням ВООЗ - "скринінг" (просіювання) означає можливе виявлення недіагностованої раніше хвороби за допомогою тестів, обстежень чи інших процедур, що дають швидку відповідь. Основна мета первинної діагностики СХО полягає в тому, щоб виявити здорових і відібрати осіб для наступного уточнення діагнозу. Програми первинної біохімічної діагностики спадкових хвороб можуть бути масовими і селективними. Масове дослідження належить до числа принципових нововведень практики світової охорони здоров'я XX століття і характеризується наступним:

1. Бездобрний підхід до обстеження.

2. Профілактичний характер обстеження.
3. Масовий характер обстеження.
4. Двоетапний характер обстеження: скринінг не дає можливості встановити остаточний діагноз, а лише виявляє можливих хворих, які повинні бути обстежені повторно і у яких слід підтвердити діагноз.

Таким чином, скринінг - це обстеження контингентів з метою поділу їх на групи з високою і низькою вірогідністю захворювання.

Спадкові хвороби обміну речовин, які включаються в скринінгові програми, відбираються за наступними критеріями:

1. Захворювання, що призводять до вираженого зниження праце- і життєздатності без своєчасного виявлення і лікування.
2. Захворювання, досить поширені в популяції (частота не менше 1:50000-200000 немовлят).
3. Захворювання, що піддаються лікуванню з досягненням принципового успіху для хворого і для яких розроблені ефективні методи профілактики.
4. Захворювання, для яких розроблений адекватний просіюючий тест.

Цим критеріям в європейських популяціях точно відповідають фенілкетонурія, гіпотиреоз, менш точно - адреногенітальний синдром (природжена адренальна гіперплазія) і галактоземія.

Масовий скринінг передбачає обстеження всіх немовлят за допомогою простих діагностичних тестів. Селективний скринінг проводиться, як правило, серед спеціальних контингентів розумово відсталих, дітей з порушенням зору, слуху, мови, опорно-рухового апарату, а також із групи ризику за СХО, виявленої при масовому скринінгу. Селективні діагностичні програми передбачають перевірку біохімічних аномалій обміну (сеча, кров) у пацієнтів, у яких підозрюються генні спадкові хвороби. У селективних програмах можуть використовуватися прості якісні реакції (наприклад, тест із хлоридом заліза для виявлення фенілкетонурії чи динітрофеніл-гідразином для виявлення кетокилот) або більш точні методи, що дозволяють виявити великі групи відхилень. Наприклад, за допомогою тонкошарової хроматографії сечі і крові можна діагностувати спадкові порушення обміну амінокислот, олігосахаридів і глікозаміногліканів (мукополісахаридів). Газова хро-матографія застосовується для виявлення спадкових хвороб обміну органічних кислот. За допомогою електрофорезу гемоглобінів діагностується вся група гемоглобінопатій. Для поглибленого біохімічного аналізу - від кількісного визначення метаболіту до встановлення активності ферменту (використання нативних тканин, або культивованих клітин), наприклад, за допомогою флуорометричних методик.

Показаннями для застосування біохімічних методів діагностики в немовлят є такі симптоми, як судоми, кома, блювота, гіпотонія, жовтяниця, специфічний запах сечі і поту, ацидоз, порушена кислотно-лужна рівновага, припинення росту. У дітей біохімічні методи використовуються у всіх випадках підозри на спадкові хвороби обміну речовин (затримка фізичного і розумового розвитку, втрата надбаних функцій, специфічна для спадкової хвороби клінічна картина).

Біохімічні методи застосовуються для діагностики спадкових хвороб і гетерозиготних станів у дорослих (гепатолентикулярна дегенерація, недостатність альфа-1-антитрипсину, недостатність Г-6-ФД та ін.).

Які захворювання входять в обов'язкову програму скринінгу в Україні?

Згідно з чинним законодавством України кожна дитина проходить скринінг новонароджених — обстеження на 4 спадкових захворювання. Кожна з включених в обов'язковий список хвороба несе серйозну загрозу для життя і здоров'я дітей, тому їх раннє виявлення дуже важливе. Своєчасність діагностики та призначення лікування істотно знижує ризики інвалідності та наслідки недуг для малюка.

– **Муковісцидоз** — генетичне мультисистемне захворювання, що займає одне з лідируючих місць у світі серед недуг спадкового типу. Проявляється хвороба порушенням роботи дихальних шляхів та шлунково-кишкового тракту. При цьому рідина, що продукується організмом, густіє до стану слизу на клітинному рівні, тим самим порушує роботу органів. Муковісцидоз провокує виникнення у хворих інфекційних захворювань, таких як бронхіт або пневмонія. При своєчасному діагностуванні недуги методом проведення неонатального скринінгу істотно знижуються ризики, пов'язані з ускладненнями хвороби, інвалідністю, зростає тривалість життя.

– **Фенілкетонурія (ФКУ)** — спадковий дефіцит вироблення ферменту, який відповідає за розщеплення амінокислот, зокрема фенілаланіну. Ця речовина зустрічається в багатьох продуктах, тому спеціальна дієта, прийом препаратів просто необхідні для нормальної життєдіяльності людини. Без медичної допомоги ФКУ призводить до розумової відсталості та важкого ураження ЦНС.

– **Адреногенітальний синдром (АГС)** — порушення в роботі надниркових залоз, вироблення гормонів. Хвороба добре піддається лікуванню. При відсутності специфічного лікування, призводить до передчасного статевого дозрівання, при цьому сіль втратна форма даного синдрому, може мати фатальні наслідки.

– **Вроджений гіпотиреоз** — захворювання, що порушує роботу щитоподібної залози, корекція хвороби проводиться прийомом гормональних препаратів (такі діти не виліковуються повністю, але їх стан можна компенсувати прийомом гормональних препаратів). При відсутності належного лікування у дитини проявляється відставання у фізичному і розумовому розвитку. Вроджений гіпотиреоз включений в обов'язковий неонатальний скринінг в Україні.

Методика

Неонатальний скринінг на муковісцидоз та інші спадкові захворювання проводиться методом забору крові з п'ятки. Декілька крапель крові з п'ятки малюка наносять на спеціальну тест-картку з фільтрувального паперу, після чого її висушують та відправляють до лабораторії.

Алгоритм проведення аналізу новонароджених

Як підготувати малюка до дослідження?

Неонатальний скринінг потрібно проводити всім новонародженим у пологовому будинку. Для забору крові для дослідження спеціальної підготовки не потрібно. Кров береться через 3 години після останнього годування.

Як проводиться забір крові

Проводиться неонатальний скринінг за алгоритмом:

1. п'ятка новонародженого дезінфікується, проводиться прокол скарифікатором;
2. краплі крові наносяться на підготовлену тест-картку так, щоб виділені кружечки були повністю просочені кров'ю;
3. зразки висушуються протягом 2-3 годин;
4. тест-картка упаковується в підготовлений конверт і відправляється на дослідження до спеціалізованої лабораторії;

Інтерпретація результатів аналізу

Результати неонатального скринінгу за термінами готуються протягом 10-20 днів після забору крові в державних лабораторіях, в приватних лабораторіях цей період становить від 3-х днів. Повідомлення про результат дослідження в державній лабораторії, батьки отримують тільки у випадку виявлення порушень. Якщо забір крові робився в приватну лабораторію, відповіді надсилаються батькам або в електронному вигляді або видаються їм особисто на паперовому носії.

Правила проведення та клінічні рекомендації:

У доношених дітей забір крові проводиться в перші 48-72 години, після народження. Раніше проводити дослідження не має сенсу у зв'язку з високою вірогідністю недостовірного результату. Для дітей, що народилися раніше терміну, кров бажано брати на 7 – 11 добу після народження. У разі виявлення відхилень рекомендований огляд новонародженого лікарем та проведення повторного дослідження.

Неонатальний скринінг за і проти

Вище представлена інформація дає поняття про те, що таке неонатальний скринінг і для чого він потрібен. Істотною перевагою цього методу є можливість діагностування важких генетичних захворювань у дітей на ранніх термінах. Адже своєчасне лікування таких недуг дає можливість малюкам та їхнім батькам жити повноцінним життям. Недоліком процедури можна назвати “людський фактор” та хибнопозитивні результати, через які найчастіше виявляються “неправильні відповіді”. Однак цей показник дуже малий, на помилку з вини персоналу припадає менше 1% з 100%.

Тема 10. Програми селективного скринінгу в діагностиці СХО.

На підставі даних сучасної біохімічної генетики можна пояснити, яким чином генетична інформація транслюється при синтезі білків зі специфічними метаболічними або структурними особливостями. Успадковані мутації можуть призводити як до порушення первинної структури білка, так і до зміни кількості синтезованого специфічного білка. Якщо процес, порушений природженим дефектом метаболізму, має істотне значення для здоров'я і якщо ступінь змін достатній для прояву патологічного процесу, то можуть виявлятися клінічні ознаки. Деякі генетичні зміни не супроводжуються клінічними проявами і лише визначають поліморфізм, що відрізняє одного індивіда від іншого. Інші зміни можуть виявлятися лише за певних умов, які впродовж усього життя можуть і не виникнути. Нарешті, ймовірні такі генетичні порушення, які викликають захворювання, виразність якого коливається від дуже по-мірних проявів до станів, що призводять до летального наслідку. У більшості випадків природжені по-рушення обміну речовин з клінічними наслідками проявляються (або можуть бути виявленими) в період новонародженості. Такі немовлята відразу після народження звичайно виглядають здоровими, однак ознаки патології, такі як летаргія, утруднення при годівлі, судоми, блювота та ін., можуть проявитися в них уже через кілька годин.

Деякі порушення метаболізму можуть залишитися нерозпізнаними в період новонародженості і діагноз може бути поставлений тільки через кілька місяців і навіть років. Ранні клінічні прояви звичайно неспецифічні і можуть бути віднесені до перинатальної патології. Природжене порушення обміну речовин має розглядатися як можливий стан у будь-якої дитини з одним із зазначених клінічних проявів:

- незвичайний запах, зокрема, під час гострого захворювання;
- інтермітуючі епізоди необгрунтованої блювоти, ацидозу, порушень психіки, кома;
- ниркова колька, гепатомегалія.

Класифікація молекулярних порушень обміну речовин

1. Порушення метаболізму амінокислот:
 - 1.1. Фенілаланіну (фенілкетонурія);
 - 1.2. Тирозину (тирозинемія, алькаптонурия);
 - 1.3. Метіоніну (гомоцистинурия);
 - 1.4. Цистину (цистинурия);
 - 1.5. Триптофану (хвороба Хартнупа, триптофанемія та ін.);
 - 1.6. Лейцину (хвороба кленового сиропу);
 - 1.7. Гістидину (гістидинурия, гістидинемія) та інших амінокислот.
2. Порушення метаболізму вуглеводів:

- 2.1. Галактози (галактоземія);
- 2.2. Фруктози (фруктоземія);
- 2.3. Глікогену (глікогенози);
- 2.4. Дисахаридозні ентеропатії (синдром мальабсорбції вуглеводів).
3. Спадкові хвороби обміну сполучної тканини:
 - 3.1. Мукополісахаридози;
 - 3.2. Хвороба Марфана.
4. Спадкові хвороби обміну ліпідів:
 - 4.1. Гіперліпопротеїнемія;
 - 4.2. Сфінголіпidoзи (хвороба Німанна - Піка);
 - 4.3. Гангліозидози (хвороба Тея - Сакса).
5. Спадкові хвороби порфіринового обміну (порфіри).
6. Ензимопатії жовчно-пігментного обміну (хвороба Жильбера).
7. Ензимопатії панкрео-інсулярного гормонсинтезу:
 - 7.1. Муковісцидоз;
 - 7.2. Уроджена відсутність ензимів підшлункової залози;
 - 7.3. Хвороба Вільсона - Коновалова;
 - 7.4. Целиакія.
8. Ензимопатії біосинтезу гормонів.

Мутації, які викликають зміну структурних, транспортних і ембріональних білків, призводять до спадкових хвороб. Хвороби обміну білків можуть виникати внаслідок порушення їх синтезу на рівні претранскрипційному, транскрипційному і трансляційному. Більш ніж для 50 % білків зміни генетичної природи призводять до загибелі клітин.

Нестача фібриногену (рецесивна ознака) призводить до порушення згортання крові; аномальний фібриноген (домінантна ознака) - причина незгортання крові; поява аномального кріоглобуліну зумовлює нестерпність холоду з розвитком артралгій, пропасниці і кропивниці (Пішак, Захарчук, 2009).

Порушення метаболізму амінокислот

Алькаптонурія

Це захворювання належить до патології обміну тирозину і зумовлене нестачею ферменту гомогентизинази з нагромадженням в організмі та екскрецією з сечею гомогентизинової кислоти.

Передається за аутосомно-рецесивним типом.

Ознаки нестачі ферменту гомогентизинази можуть спостерігатися незабаром після народження. Сеча дитини зафарбовує пелюшки в чорний колір (внаслідок окиснення на повітрі гомогентизинової кислоти). Повільне накопичення чорного пігменту призводить до поступового чорного забарвлення (охроноз) щік, носа, склер, вух. З ростом дитини розвиваються дефекти сполучної тканини, артрити.

Ідентифікувати гомогентизинову кислоту можна декількома методами:

- додавання луку до сечі викликає її потемніння;
- реакція з хлоридом заліза призводить до появи пурпурно-чорного забарвлення.

Остаточний діагноз може бути підтверджений за допомогою тонкошарової хроматографії або ферментативним визначенням гомогентизату в плазмі крові.

Ефективних способів лікування охронозу, який розвинувся внаслідок алькаптонурії, немає. Рекомендується С-вітамінотерапія і дієтотерапія. З раціону виключають продукти тваринного походження (м'ясо, яйця, сир). Критерієм ефективності лікування є зникнення темного кольору сечі.

Гомоцистинурія

Гомоцистинурія описана в 1962 р. Карсеном і Нейлом. До нинішнього часу описано більше 100 хворих. В основі захворювання є відсутність чи зниження активності ферменту цистатіонінсинтетази, він потребує в якості кофактора вітамін В₁₂, а в якості

субстрату - фолієву кислоту. Гомоцистеїн є проміжним продуктом розпаду метіоніну й у нормі не міститься у плазмі і сечі, але дефекти на трьох різних етапах ферментації можуть призвести до гомоцистинемії і гомоцистинурії. Існує класична гомоцистинурія, піридоксинчутлива і піридоксинрезистент-на. Захворювання є аутосомно-рецесивним, частина складає 1:200000 населення.

Клінічні прояви гомоцистинурії різні, однак найбільш характерні такі: розумова відсталість, ектопія кришталіків, кісткові деформації, тромбоемболії і серцево-судинна патологія. Такі діти при народженні виглядають здоровими.

Діагноз встановлюють у віці 3-х років, коли виявляють підвивих кришталіка, але в більшості випадків яскрава клініка розвивається до 10 років. Батьки помічають, що під час швидкого руху головою райдужки дитини тремтять. Потім приєднуються й інші очні симптоми: міопія, астигматизм, глаукома, катаракта, відшарування сітківки, атрофія зорового нерва. Аномалії скелета у таких дітей виявляються особливо часто. Насамперед звертає увагу диспропорційність статури у вигляді укорочення тулуба, подовження кінцівок, помірно виражений остеопороз кісток, сколіоз, викривлення гомілки, деформації грудної клітки, високе піднебіння, порожниста стопа. У цих дітей блакитні очі і специфічна еритема у формі метелика (палаючі вилиці) й еритематозна плямистість кінцівок. Часто прогресує розумова відсталість, однак у деяких хворих інтелект не порушений. Близько 10-15 % хворих страждають на судоми. Наступним ускладненням цього захворювання є тромбоемболія судин різного діаметра, зокрема головного мозку, вона може проявлятися в будь-якому віці.

Діагностика захворювання полягає у виявленні гомоцистину в сечі.

Проводять пробу з нітропрусидом, а також паперову хроматографію амінокислот. Визначають вміст амінокислот у плазмі.

Лікування включає: великі дози вітаміну В6 і фолієвої кислоти, дієтотерапію - продукти з низьким вмістом метіоніну. Припустимий вміст метіоніну – 29-45 мг на 1 кг маси 1 раз на добу. Замість коров'ячого молока можна використовувати козяче, котре містить менше метіоніну, а також кобиляче молоко.

Хвороба кленового сиропу

Декарбоксілювання лейцину, ізолейцину і валіну здійснюється ферментною системою, яка використовує в якості коферменту тіамінпірофосфат. За його відсутності розвивається хвороба "кленового сиропу". Свою назву захворювання одержало через специфічний солодкий запах, що йде від рідин організму, особливо від сечі.

При народженні діти виглядають здоровими. Але на 1-му тижні життя в них порушується травлення, вони втрачають апетит і з'являється блювота. Швидко розвивається коматозний стан. Виявляють гіпертонус, неврологічні симптоми, подібні з такими при сепсисі чи менінгіті. З'являються судоми, гіпоглікемія. Виражений метаболічний ацидоз. У нелікованих хворих смерть настає в перші тижні чи місяці життя.

Діагноз може бути запідозрений завдяки специфічному запаху, що йде від сечі, поту і т.д. Підтверджується він тонкошаровою хроматографією амінокислот. У сечі лейцин, валін, ізолейцин виявляють шляхом додавання декількох крапель 2,4-динітрофенілгідразину, при позитивній пробі утворюється жовтий осад.

Для харчування хворих дітей використовують суміші, які не містять зазначених амінокислот.

Прогноз залишається серйозним (Пішак, Бажора, 2009).

Цистинурія

Цистинурія - захворювання, пов'язане з порушенням обміну цистину, успадковується за аутосомно-рецесивним типом. У таких хворих відсутня транспортна система, що виводить цистин з лізосом. Цистин, накопичуючись у нирках, сприяє розвитку симптомокомплексу, який включає поліурію, лихоманку, гіпотрофію і втрату апетиту. Інтелектуально діти розвиваються нормально, але відстають у фізичному розвитку. У віці 1-го року дитина не ходить і не стоїть, у неї розвивається рахіт. У рогівці

виявляють кристалічні відкладення. Погіршується функція нирок, наростає фотофобія, ацидоз. За умови відсутності терапевтичних втручань хворі гинуть від хронічної ниркової недостатності до кінця 1-го десятиріччя життя.

Діагностика цистинурії полягає у виявленні кристалів цистину в рогівці і нирковій тканині, протеїнурії, глюкозурії, лужної реакції сечі у дитини з ацидозом.

Лікування захворювання тільки симптоматичне (Пішак, Бажора, 2009).

Хвороба Хартнупа (хвороба порушення обміну триптофану).

Хвороба Хартнупа є рідкісним захворюванням, пов'язаним з аномальною реабсорбцією і екскрецією триптофану та інших амінокислот. Симптоми включають висипання, порушення ЦНС, низький зріст, головні болі, а також непритомність і колапси. Діагноз ґрунтується на визначенні високого вмісту в сечі триптофану та інших амінокислот. Профілактичне лікування включає ніацин або ніацинамід, а при атаках призначають нікотинамід.

Хвороба Хартнупа успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Розвивається знижене всмоктування в тонкому кишечнику триптофану, фенілаланіну, метіоніну та інших моноаміномонокарбонових амінокислот. Накопичення невсосавшихся амінокислот в ШКТ збільшує їх метаболізацію бактеріальної флорою. Деякі продукти деградації триптофану, включаючи індоли, кінуренін і серотонін, всмоктуються в кишечнику і з'являються в сечі. Також порушується ниркова реабсорбція амінокислот, що викликає генералізовану Аміноацидурия, включаючи всі нейтральні амінокислоти, за винятком проліну і гідроксипроліну. Також порушується перетворення триптофану в ніацин.

Симптоми, ознаки, діагностика.

Практично завжди появи симптомів передують низьке надходження поживних речовин. Симптоми і ознаки розвиваються внаслідок дефіциту ніацинамідів і нагадують прояви пелагри, особливо висип на відкритих ділянках тіла. Неврологічні прояви включають мозжечкову атаку та психічні порушення. Часто відзначаються затримка розумового розвитку, низький зріст, головні болі, колаптоїдний стан, непритомність. Незважаючи на те що захворювання присутній з народження, симптоми можуть з'явитися в грудному віці, в дитячому віці або у молодих дорослих. Поява симптомів може провокуватися інсоляцією, деякими лікарськими препаратами або іншими стресами.

Діагноз ґрунтується на виявленні характерних порушень екскреції амінокислот з сечею. Індоли та інші продукти деградації триптофану в сечі є додатковим свідченням наявності хвороби Хартнупа.

Лікування

Прогноз сприятливий, частота атак зазвичай знижується з віком. Напади можна запобігти, підтримуючи хороший нутритивний статус і доповнюючи раціон ніацином або ніацинамідом по 50-100 мг всередину 3 рази на день. Розвинувся напад лікують нікотинамідом, по 20 мг всередину 1 раз на день.

Порушення обміну вуглеводів

Галактоземія

Перший опис цього спадкового захворювання належить віденському педіатру Реуссу (1808). Це уроджене порушення галактозного обміну і передається аутосомно-рецесивним шляхом. Частота захворювання від 1:16000 до 1:17500 населення.

Патогенез хвороби зумовлений блоком у процесі розпаду галактози до глюкози, що здійснюється під дією галактокінази і галактозо-1-фосфатуридилтрансферази. Прийнято вважати, що патологічні ушкодження викликані нагромадженням у клітинах галактозо-1-фосфату і порушенням клітинного метаболізму.

Клінічна картина галактоземії залежить від ступеня ензимного дефекту і кількості галактози, що надходить з їжею. У типових випадках захворювання виявляється в перші дні і тижні. Немовля неохоче приймає молоко, у нього відсутній апетит, виникають блювота, здуття живота, диспепсія, персис-туюча жовтяниця, гіпоглікемія. Жовтяниця спочатку нагадує фізіологічну, але на 5-6 день посилюється. У тяжких випадках

захворювання різко прогресує і призводить до коми і смерті. У більшості випадків перебіг захворювання більш тривалий: дитина на недодає в масі і зрості, збільшуються печінка і селезінка, з'являється асцит. Іноді приєднуються симптоми геморагічного діатезу. Має місце поява катаракти на 3-му тижні життя, яка прогресує і призводить до повної сліпоти. Характерне значне відставання у психомоторному розвитку. За легких форм перебігу захворювання відсутні багато клінічних ознак, але завжди є катаракта і гепатоспленомегалія.

Діагностика полягає у виявленні галактозурії (методом уринолізу), протеїнурії, гіпераміноацидурії. Діагноз уточнюють шляхом тонкошарової хро-матографії вуглеводів.

Єдиним методом лікування є харчування, позбавлене лактози. З харчового раціону виключають грудне і коров'яче молоко.

Дітям до 1-го року дають соєве молоко, суміші типу "Малютка" з декстринмальтозою, суміші з окремими видами борошна "Мальш", низьколактозне молоко. Дієта дітей після 1 року більш різноманітна, але з неї виключають молочні продукти, шоколад, каву, субпродукти, квасолю, горох, молоду картоплю. Дієту призначають на тривалий час, не менше 5-7 років. Критерієм ефективності лікування є відсутність галактози в сечі.

Призначенням дієти до клінічно виражених проявів хвороби вдається попередити метаболічні розлади і розвиток дитини буде нормальним. Якщо дієта призначена в період нерізко виражених проявів - можна домогтися компенсації порушень метаболізму. Використовують оперативне лікування катаракти.

Має місце антенатальна профілактика захворювання у плоду шляхом призначення безлактозної дієти майбутній матері.

Змістовий модуль 4. Молекулярно-генетичні методи діагностики спадкової патології.

Конкретні цілі.

- Засвоїти базові молекулярні методи дослідження.
- Засвоїти показання для проведення молекулярних методів діагностики спадкової патології.
- Інтерпретувати результати ДНК-діагностики моно генних та інфекційних захворювань.
- Диференціювати методи прямої та непрямой молекулярної діагностики спадкової патології.
- Пояснити метод ПЛР як базовий метод молекулярної діагностики.
- Ідентифікувати типи мутацій за допомогою визначених молекулярних методів.
- Знати структуру та функцію ядерного та мітохондріального геному):

Тема 10: Сучасні методи ДНК-діагностики спадкової патології.

Студент повинен знати:

1. Методи ДНК-діагностики спадкової патології.
2. Показання до проведення цих методів.
3. Новітні технології в молекулярній діагностиці.
4. Мітохондріальний геном.
5. Популяційні дослідження мітохондріальної ДНК.

Короткий виклад теоретичного матеріалу:

За допомогою прямих методів виявляються порушення в первинній нуклеотидній послідовності ДНК (мутації і їх типи). Прямі методи відрізняються точністю, що досягає майже 100%. Проте на практиці зазначені методи можуть застосовуватися за певних умов:

- 1) відомої цитогенетичної локалізації гена, відповідального за розвиток спадкового захворювання,
- 2) повинен бути клонованим ген захворювання і відома його нуклеотидна послідовність.

Метою прямої діагностики є ідентифікація мутантних алелей (порушення в первинної нуклеотидної послідовності ДНК, мутації і їх типи). Висока точність методу прямої ДНК-діагностики в більшості випадків не вимагає ДНК-аналізу всіх членів сім'ї, оскільки виявлення мутації у відповідному гені дозволяє майже зі 100-процентною точністю підтвердити діагноз і визначити генотип усіх членів сім'ї хворої дитини, включаючи гетерозиготних носіїв.

Недоліком методу прямої ДНК-діагностики є необхідність знання точної локалізації гена і спектру його мутацій. Методи прямої ДНК-діагностики показані для таких захворювань, як фенілкетонурія (мутація R408W), муковісцидоз - (найбільш часта мутація delF508), хорея Гентінгтона (експансія трінуклеотидних повторів-СТG-повтори) і ін. Однак до теперішнього часу гени багатьох захворювань не картіровані, невідома їх екзонів-інтрони організація, і багато спадкових хвороб відрізняються вираженою генетичною гетерогенністю, що не дозволяє повною мірою використовувати прямі методи ДНК-діагностики. Тому інформативність методу прямої ДНК-діагностики широко варіює. Так, при діагностиці хореї Гентінгтона, ахондроплазії вона становить 100%, при фенілкетонурії, муковісцидозе, адреногенітальному синдромі - від 70 до 80%, а при хворобі Вільсона-Коновалова та міопатії Дюшенна / Бекера - 45-60%. У зв'язку з цим використовуються непрямі методи молекулярно-генетичної діагностики спадкових хвороб.

Непрямі методи ДНК-діагностики

Непрямі методи ДНК-діагностики засновані на аналізі зчеплення з досліджуваним геном певного поліморфного локусу (маркера), за допомогою якого можна виконувати маркування як мутанти, так і нормальних алелів і проаналізувати їх передачу в поколіннях, тобто серед родичів обстежуваної особи. Це особливо важливо при вирішенні питання про пренатальної (допологової) діагностики спадкового захворювання.

При використанні непрямих методів ДНК-діагностики слід пам'ятати - чим тісніше зчеплення між маркерним локусом і мутантну, тим точніше діагноз. Щоб звести до мінімуму помилку діагностики, необхідно по можливості використовувати внутрішньогенні маркери або використовувати два маркерних локуси, фланкують мутантний алель.

Мутаційна мінливість в сайтах рестрикції може бути визначена по зміні довжини рестрикційних фрагментів ДНК, гібридизуючихся зі специфічними ДНК-зондами (ПДРФ-аналіз; Restriction Fragment Length Polymorphism, або RFLP-аналіз).

Метод ПДРФ-аналізу включає проведення декількох етапів дослідження: виділення геномної ДНК; рестрикція виділеної ДНК за допомогою специфічних ендонуклеаз; електрофоретичного розділення фрагментів ДНК; ідентифікація фрагментів ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції за допомогою блот-гібридизації за Саузерн. При відсутності рестрикції ДНК за даними радіоавтографії буде виявлятися великий (нерозрізаний фрагмент, або бенд).

При наявності рестрикції буде виявлятися менший за розмірами фрагмент. У осіб, гомозиготних за даним спадкового захворювання, буде виявлятися один бенд, в той час як в осіб, гетерозиготних по даному спадкового моногенними дефекту, будуть визначатися обидва фрагмента. ПДРФ-аналіз значно спрощується, якщо є можливість специфічної ампліфікації ділянки ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції. Проведення в цьому випадку ПЛР-реакції і рестрикції ампліфікованої фрагмента дозволяє провести тестування стану цього локусу.

Таким чином, непряма ДНК-діагностика проводиться в наступних випадках:

- 1) коли ген не ідентифікували, а лише картірован на певній хромосомі,
- 2) коли методи прямої ДНК-діагностики не дають результату (наприклад, в силу великої протяжності гена або широкому спектрі мутаційних змін,
- 3) при складній екзонів-інтронів організації гена.

При використанні непрямих методів ДНК-діагностики потрібно сімейний аналіз алелей поліморфних маркерів. Для непрямой діагностики можуть використовуватися так звані гіперваріабельні сателітні повтори. Вони є більш інформативними методами, ніж ПДРФ-аналіз, оскільки володіють високим рівнем гетерозиготності і щільно розташовані в кожній з хромосом. В останні роки використовуються короткі тандемні повтори (STR-повтори, short tandem repeats), які стабільно успадковуються і володіють великим рівнем поліморфізму, а також короткі секвенувати послідовності ДНК з відомою генною локалізацією, так звані STS-повтори (sequence tagged sites).

Останні мають виражену індивідуальну специфічність, стабільно успадковуються за законами Менделя і знаходять широке застосування для молекулярно-генетичної діагностики моногенних хвороб. Вони можуть також використовуватися в якості молекулярних маркерів мутантних хромосом у родинах високого ризику. Непрямі методи ДНК-діагностики можуть використовуватися в пренатальній діагностиці практично для всіх моногенних захворювань. Однак для цього необхідно мати знання про те, що локус є високополіморфним і знаходиться поблизу від мутантного гена або всередині нього. Тому для діагностики потрібно обстеження як можна більшого числа родичів (в першу чергу батьки-діти), щоб простежити шлях передачі маркерів потомству. Це підвищує інформативність обраного маркера.

У сучасному світі розвиток більшості наукових дисциплін безпосередньо пов'язано з розвитком методів дослідження. У 1983 років американський вчений Кері Мюлліс винайшов полімеразну ланцюгову реакцію, отримавши згодом за це Нобелівську премію. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, PCR) - це метод ферментативного одержання великої кількості копій (ампліфікації) досліджуваних фрагментів ДНК шляхом повторних циклів реплікації і денатурації (поділу ланцюга ДНК на окремі нитки). При цьому відбувається копіювання тільки досліджуваної ділянки ДНК, оскільки тільки ця ділянка відповідає заданим умовам. І тільки в тому випадку, якщо він присутній в досліджуваному зразку.

Для протікання цієї реакції необхідні три ключові компоненти.

По-перше, служить матрицею молекула ДНК, що містить досліджуваний фрагмент.

По-друге, ДНК-полімераза (фермент для виробництва копій ДНК) і нуклеотиди, використовувані ДНК-полімеразою для синтезу ДНК.

І по-третє, два праймера ПЛР - два коротких сегмента одониткових нуклеїнової кислоти, комплементарних початку досліджуваного фрагмента.

Можна сказати, що метод ПЛР імітує в пробірці природну реплікацію ДНК, повторювану багато разів і стільки, скільки це необхідно для дослідження. Метод включає кілька етапів. Спочатку відбувається розплетання подвійної спіралі ДНК, розбіжність ниток ДНК і подальше комплементарне доповнення (добудова) обох за допомогою спеціального ферменту. Реплікація ДНК може початися не в будь-якій точці, а тільки в певних "стартових блоках" - коротких двуниткових ділянках. Для проведення такого процесу використовують дві генетичні проби - праймери, які служать в якості приманки для синтезу другий ланцюга на одониткових ДНК. Праймери - це штучно синтезовані короткі нуклеотидні послідовності (15-30 нуклеотидів), комплементарні кінцям розмножуваних (ампліфікується) ділянок ниток ДНК. Зрозуміло, що, щоб мати потрібні праймери, необхідно знати нуклеотидну послідовність тієї ділянки ДНК, який потрібно розмножити. Спочатку двуниткову ДНК нагрівають до температури близько 100 ° С. ДНК денатурує та комплементарні нитки ДНК розходяться. Далі до обох нитках ДНК за принципом комплементарності приєднують праймери, в результаті чого утворюються короткі двуниткові - "стартові блоки". Праймери приєднуються в напрямку з 3', - кінця ланцюжка ДНК, по одному на кожен ланцюг, тому добудовування нового ланцюга ДНК в подальших циклах відбувається в обмеженому праймерами ділянці ДНК. Наступна стадія полягає у подовженні нової ланцюжка ДНК за допомогою приєднання наявних в реакційній суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів. Процес подовження починається

від праймерів і здійснюється за допомогою ферменту - ДНК-полімерази при температурі 72 С (специфічний бактеріальний фермент - Таq-полімераза, стійка до високих температур). Полімераза здійснює синтез другого ланцюга ДНК на кожній з двох денатурованих ланцюгів після нового прогріву. Знову синтезовані фрагменти ДНК служать в якості матриці для синтезу нових ниток в наступному циклі ампліфікації - це і є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Процедура ПЛР включає кілька високотемпературних етапів, тому використовуються термостабільні ДНК-полімерази. У ході реакції послідовно змінюють температуру: при температурі 90-95 градусів відбувається розділення кіл ДНК, при температурі 40-60 градусів - приєднання праймера (отжиг), при температурі 72 градуси - синтез ланцюгів ДНК.

Дані полімерази виділяються з термостійких бактерій, що живуть у гарячих джерелах при температурах до 90 ° С. Найчастіше це Таq-полімераза бактерій *Thermus aquaticus*, Тth-полімераза (*Thermus thermophilus*), Рwo-полімераза (*Pyrococcus woesei*). В даний час в ПЛР часто використовуються суміші полімераз з різними властивостями, включаючи штучно отримані модифікації природних ферментів.

Так як процес ПЛР вимагає постійної зміни циклів з кількома різними температурами, сучасні апарати для ПЛР - термоциркулятори - працюють в режимі швидкої зміни температури реакційної суміші за заданою програмою і здатні ампліфікувати фрагмент ДНК довжиною від 100 до 3000 пар основ протягом декількох годин, починаючи з мікрограма ДНК (що оптимально), але можуть почати процес і з мільйонної частки мікрограма. У крайньому випадку можна використовувати як вихідний матеріал ДНК з однієї клітини, такий як клітина сперми, і отримати більше 100 млрд. копій досліджуваного фрагмента.

Одним з практичних застосувань ДНК-технології є її використання для ідентифікації людей за зразком крові або інших тканин. Цей метод використовується в криміналістиці для визначення провини або невинності обвинувачених або для встановлення батьківства.

Більшість фізичних відмінностей між людьми виникає внаслідок складних взаємодій декількох генів в процесі розвитку. Деякі з них очевидні з першого погляду, інші є більш тонкими, як, наприклад, відбитки пальців, (малюнок яких також залежить більш ніж від одного гена). Ще одним, на більш фундаментальний набір ідентифікаційних ознак є білки, що виробляються всіма клітинами. Як приклад відмінностей між білками можна навести різні групи крові, характерні для людей. Білки, що містяться в крові, виявляються за допомогою антитіл. Тому зазвичай їх називають антигенами крові. З'єднання антитіла зі своїм антигеном дуже специфічно. Відповідно, два споріднених білка з відносно невеликими відмінностями форми можна диференціювати, оскільки вони будуть приєднуватися до різних антитіл. Самим унікальним є визначення генотипу. Існує два основних типи такого аналізу - зняття відбитків ДНК та ПЛР.

ПЛР використовується, коли кількість ДНК недостатньо або ДНК занадто зруйнована для зняття відбитків ДНК. До того ж зняття відбитків ДНК вимагає щодо довгих ниток ДНК. ПЛР найбільш корисна для ділянок ДНК з високою індивідуальною мінливістю: якщо два зразки збігаються в декількох зонах з високою мінливістю, то вони, ймовірно, належать одній і тій же людині. Основна відмінність між методами полягає в тому, що зняття відбитків ДНК засноване на унікальності малюнка смуг, утвореного поруч фрагментів ДНК після їх поділу по довжині за допомогою гель-електрофорезу, тому що рестрикційних ферментів нарізають фрагменти різної довжини у різних людей, а аналіз ПЦР покликаний визначити присутність або відсутність певних послідовностей.

Діагностика інфекційних захворювань

ДНК-діагностика - нова галузь медицини, яка використовує молекулярно-генетичні методи для ранньої діагностики захворювань, виявлення схильності до них і профілактичних рекомендацій.

Розвиток таких технологій ампліфікації ДНК як ПЦР, справило буквально революцію в клінічній вірусології, дозволивши швидко, точно і досить просто визначити наявність вірусів у зразку, оскільки відомі послідовності ДНК багатьох хвороботворних мікроорганізмів. Можна створити два праймера ПЛР, відповідних послідовності досліджуваного патогена (наприклад, вірусу) і розташованих на відомій відстані на ДНК. Якщо потім виконати ПЛР з використанням цих праймерів і за допомогою гелелектрофорезу провести аналіз отриманих продуктів, то у випадку приналежності досліджуваного зразка того ж вірусу, ми отримаємо фрагмент, довжина якого відповідає взятій для порівняння послідовності ДНК. Висока специфічність ПЛР обумовлена тим, що в досліджуваному матеріалі з'являється характерний лише для даного виду збудника фрагмент ДНК.

Виявляючи поодинокі клітини бактерій або вірусів, ПЛР-діагностика виявляє наявність збудників інфекційних захворювань в тих випадках, коли іншими методами (імунологічними, бактеріологічними, мікроскопічними) це зробити неможливо.

У клінічній практиці метод ПЛР часто використовується для виявлення вірусних гепатитів, небезпечних для людини, таких як: А, В, С, "Проведення типування вірусу гепатиту С", Дельта, Е, G, TTV.

Важливу роль відіграє метод в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом (ЗПСШ). Етіологічним чинником є віруси, бактерії та найпростіші.

До таких захворювань можна віднести появу доброякісних аногенітальних бородавочок (кондилом), що викликаються вірусом папіломи людини (ВПЛ). Такі бородавки зазвичай з'являються на ділянках, травмованих під час статевого контакту. Генотипи ВПЛ 6 і 11 виявляються більш ніж в 90% випадків. Такі пацієнти можуть бути одночасно інфіковані та ВПЛ типу 16 і 18, які є джерелом субклінічних уражень, що поєднуються з внутрішньоєпітеліальний неоплазією і аногенітальних на рак. Є докази, що папіломавіруси, пов'язані з високоонкогенними (папіломавіруси високого онкогенного ризику - 16,18, 31,33,35, 39,45, 51, 56, 58, 59, 68), є етіологічним чинником виникнення раку шийки матки.

Полімеразна ланцюгова реакція дозволяє ідентифікувати досліджуваний ген і виявити в ньому наявні мутації. Оскільки відомі послідовності ДНК деяких мутантних генів, можна створити праймер, відповідний послідовності мутантного ділянки такого гена. Для ефективного здійснення ПЛР 3'-кінцевий нуклеотид праймера повинен бути компліментарний відповідного нуклеотиду матричної ДНК. В іншому випадку швидкість подовження праймера різко знижується і при певних поєднаннях помилково спарених нуклеотидів реакція може взагалі не пройти, особливо якщо умови гібридизації підібрані таким чином, щоб дуплекси утворювалися тільки при повній комплементарності гібридних пар. Саме такий підхід лежить в основі методу виявлення мутацій за допомогою аллель-специфічної ПЛР.

Однонуклеотидний поліморфізмом (ОНП) називають варіабельні позиції в послідовності ДНК геному, для яких частота зустрічальності в популяції найменш поширеного варіанту перевищує 1%. У геномі людини відомо кілька мільйонів ОНП. Не всі Однонуклеотидний заміни всередині гена призводять до фенотипическому ефекту - генетичному захворюванню, оскільки заміна нуклеотиду може не привести до змін амінокислотного складу білків та його функціональних властивостей. Але якщо ідентифікована точкова мутація, що викликає захворювання, то можуть бути отримані синтетичні олігонуклеотиди, що відповідають нормальному і мутантної послідовностей. Ці аллель-специфічні олігонуклеотиди можна використовувати в якості праймерів для аллель-специфічної ПЛР.

ОНП - основна причина існування алелів гена. У середньому на 1000 підстав в геномі людини припадає одна варіабельна позиція, при цьому розподіл ОНП нерівномірно, і частота зустрічальності на кілька порядків вище в некодуючих регіонах геному. Найбільш часто зустрічається поліморфізм - варіація підстав одного типу: А і G (пурин / пурин) або Т і С (піримідин / піримідин). Поліморфізм з алелями пурин / піримідин зустрічається значно рідше.

Завдання ДНК-діагностики - визначити спадкові варіанти поліморфізму, що є причиною моногенних або полігенних захворювань. Оскільки у людини подвійний набір всіх генів, результат діагностики повинен містити інформацію про мутації або її відсутності у кожному з парних генів. Можливі три варіанти висновку: - / - - нормальний варіант поліморфізму генів, мутація відсутня; - / + - мутація в гетерозиготною формі (у одному з парних генів); + / + мутація в гомозиготною формі (в обох парних генах). При аутосомно-домінантному спадкуванні мутація проявляється як у гомозиготному, так і в гетерозиготному вигляді; при аутосомно-рецесивним успадкування мутація проявляється тільки в гомозиготною формі.

Схема мітохондріального геному людини. Мітохондріальна ДНК (мтДНК).



Історія відкриття: мітохондріальна ДНК була відкрита Маргіт Насс і Сільвен Насс в 1963 році в Стокгольмському університеті за допомогою електронної мікроскопії і, незалежно, вченими Еллен Харлсбруннер, Хансом Туп-пі та Готтфрід Шацем при біохімічному аналізі фракцій мітохондрій дріжджів у Віденському університеті в 1964 році.

Мітохондріальна спадковість. Спадкування по материнській лінії більшості багатоклітинних організмів мітохондріальна ДНК успадковується по материнській лінії. Яйцеклітина містить на кілька порядків більше копій мітохондріальної ДНК, ніж сперматозоїд. При статевому розмноженні мітохондрії, як правило, успадковуються виключно по материнській лінії, мітохондрії сперматозоїда звичайно руйнуються після запліднення. Крім того, велика частина мітохондрій сперматозоїда знаходяться в основі джгутика, яке при заплідненні іноді втрачається.

Так як мітохондріальна ДНК має високу швидкість мутації, вона є хорошим об'єктом для вивчення філогенії (еволюційної спорідненості) живих організмів. Для цього визначають послідовності мітохондріальної ДНК у різних видів і порівнюють їх за допомогою спеціальних комп'ютерних програм і отримують еволюційне древо для вивчених видів.

Тема 12. ДНК-діагностика моногенних та інфекційних захворювань.

Студент повинен знати:

- 1.Прямі методи діагностики мутацій: метод блот-гібридації по Саузерну.
- 2.ПЛР-аналіз при спадковій патології та інфекціях.
- 3.Метод аналізу конфірмаційного поліморфізму одноланцюгових ДНК (SSCP-аналіз)
- 4.Гетеродуплексний аналіз фрагментів ДНК.
- 5.Непрямі методи діагностики мутацій.

Короткий виклад теоретичного матеріалу

Саузерн блоттінг (від англ. Southern blot) — метод, вживаний в молекулярній біології для виявлення певної послідовності ДНК в зразку. Метод Саузерн блоттінга поєднує електрофорез в агарозном гелі для фракціонування ДНК з методами перенесення розділеної по довжині ДНК на мембранний фільтр для гібридації. Метод називається по імені винахідника, англійського біолога Едвіна Саузерна.

Метод

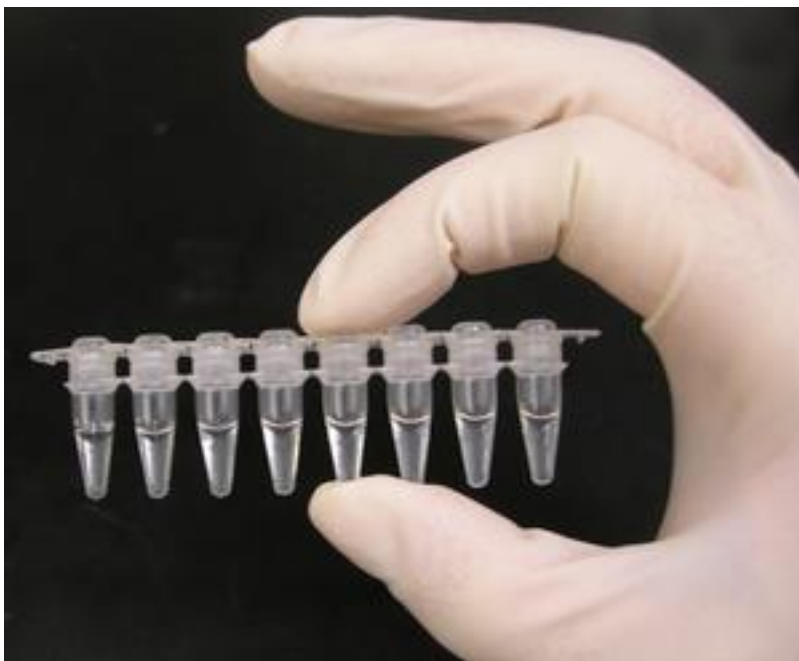
- 1.Рестрикція ендонуклеазами рестрикції для розрізання високомолекулярної ДНК на дрібніші фрагменти.
2. Фрагменти ДНК піддаються електрофорезу в агарозном гелі для розділення по довжині.
3. У випадку, якщо деякі фрагменти ДНК довше 15 кб, перед перенесенням гель обробляють, наприклад, соляною кислотою, яка викликає депурінізацію ДНК і полегшує перенесення на мембрану.
- 4.У разі, коли використовують лужний метод перенесення, агарозний гель поміщають в лужний розчин, при цьому подвійна спіраль ДНК денатурує і полегшує пов'язання негативно зарядженою ДНК з позитивно зарядженою мембраною для подальшої гібридації. При цьому руйнуються і залишки РНК.
5. Листок мембрани нітроцелюлози (або нейлоновою) поміщають зверху або знизу від агарозного гелю. Тиск здійснюють безпосередньо на гель або через декілька шарів паперу. Для успішного перенесення необхідний щільний контакт гелю і мембрани. Буфер переноситься капілярними силами з ділянки з високим вмістом води в зону з низьким вмістом води (мембрана). При цьому здійснюється перенесення ДНК з гелю на мембрану. Поліаніонна ДНК зв'язується з позитивно зарядженою мембраною силами іонообмінних взаємодій.
6. Для остаточного закріплення ДНК на мембрані, остання нагрівається у вакуумі до температури 80 °С протягом двох годинників або освітлює ультрафіолетовим випромінюванням (в разі нейлонових мембран).
7. Здійснюють гібридацію радіоактивно (флюоресцентний) міченої пробі з відомою послідовністю ДНК з мембраною.
8. Після гібридації надлишок пробі відмивають з мембрани і візуалізують продукти гібридації шляхом авторадіографії (в разі радіоактивної пробі) або оцінюють забарвлення мембрани (в разі використання хромогенного фарбування).

Результати :гібридація пробі із специфічною ділянкою ДНК, закріпленій на мембрані, вказує на наявність аналізованої послідовності нуклеотидів в пробі.

Саузерн блоттінг, який проводять з ДНК генома, обробленої ендонуклеазами рестрикції, може бути використаний для визначення числа копій генів в геномі. Проба, яка гібридується лише з одним фрагментом ДНК, який не розрізав рестриктазами, дає одну смугу на Саузерн-блоті, тоді як множинні смуги на блоте вказують на те, що проба гібридувалась з декількома ідентичними послідовностями. Зміни умов гібридації (підвищення температури, при якій проводять гібридацію, зміну концентрації солі) приводять до підвищення специфічності і зниження гібридації з близькими, але не ідентичними послідовностями.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР або PCR) — експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних

фрагментів ДНК в біологічному матеріалі (пробі). Крім простого збільшення числа копій ДНК (цей процес називається ампліфікацією), ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК), і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад для клонування генів, введення мутацій, виділення нових генів, секвенування, для створення і визначення генетично модифікованих організмів, діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства.



Набір тестових трубочок для ПЛР, кожна трубочка містить 100 μ л реагентів реакції.

Полімеразна ланцюгова реакція була відкрита Карі Муллісом[1][2]. Він був нагороджений Нобелівською премією з хімії 1993 року за це відкриття, через сім років після того, як він і його колеги з корпорації Cetus запропонували його для практичного використання. Вперше метод був винайден у 1983 році, під час роботи Мулліса в компанії Cetus в місті Емерівіль (Каліфорнія), одній з перших біотехнологічних компаній. Його задачею було створення коротких ланцюжків ДНК для інших учених. Мулліс писав, що ідея ПЛР прийшла йому, коли він вночі в своєму автомобілі їхав уздовж Каліфорнійського шосе 1[1]. Він продумував новий шлях аналізу змін (мутацій) в ДНК, коли усвідомив, що замість цього він винайшов метод ампліфікації будь-якої ділянки ДНК за допомогою повторних циклів дублювання, які б здійснював фермент ДНК-полімераза. В журналі *Scientific American* Мулліс підвів підсумок методу: «Починаючи з єдиної молекули ДНК, носія генетичної інформації, ПЛР може надати 100 мільярдів подібних молекул за кілька годин. Реакцію дуже легко провести, вона вимагає однієї тестової трубки, незначної кількості реагентів, та джерела тепла».

Фермент ДНК-полімераза зустрічається природно в живих організмах. В живих клітинах він виконує функції реплікації ДНК протягом мітозу та мейозу. Полімераза працює, зв'язуючись з одним ланцюжком ДНК та синтезуючи інший, створюючи подвійну спіраль. У першому прототипі процесу ПЛР, фермент використовувався *in vitro* (у контролюємому оточенні за межами організму). Дволанцюгова молекула ДНК розділялася на окремі ланцюжки за допомогою нагрівання до 94 °С. При цій температурі, проте, ДНК-полімераза, що використовувалася на той час, гинула, тому фермент доводилося додавати після стадії нагрівання на кожному циклі реакції. Оригінальна процедура була дуже неефективна, тому що вимагала вимагало багато часу, великих кількостей ДНК-полімерази, і безперервної уваги протягом всього процесу. Пізніше, цей оригінальний

процес ПЛР був значно вдосконалений використанням ДНК-полімерази, взятої з термофільних (теплолюбних) бактерій, що зазвичай ростуть в гейзерах за температури понад 110 °С. ДНК-полімераза, взята з цих організмів, стійка за високих температур, і при використанні у ПЛР не пошкоджується при нагріванні до необхідної температури. З тих пір, як необхідність додавати нову ДНК-полімеразу на кожному циклі зникла, процес копіювання ДНК був спрощений і автоматизований. Одна з перших теплостійких ДНК-полімераз була отримана від бактерії *Thermus aquaticus* і стала відома під назвою «Taq». Taq-полімераза широко використовується для ПЛР і зараз. Проте, її недоліком є те, що через відсутність механізму корекції помилок у 3'→5' напрямку, вона робить відносно велику кількість помилок при копіюванні ДНК, що приводить до мутацій. Нові полімерази, такі як Pwo або Pfu, отримані з архей, мають такий механізм корекції і можуть значно скоротити число мутацій, які зустрічаються в копійованій послідовності ДНК. Проте, ці ферменти полімеризують ДНК набагато повільніше, ніж Taq. Зараз доступні комбінації Taq і Pfu, що забезпечують як високу процесивність (протяжність ділянки, що синтезується за одне зв'язування ферменту, і в результаті швидкість синтезу), так і високу точність копіювання ДНК. ПЛР зараз може виконуватися на фрагментах ДНК розміром більше 10 kbp (тисяч пар основ), але середній розмір ділянки ДНК, що ампліфікується, - від кількох сотень до кількох тисяч пар основ ДНК. Проблема з довгими фрагментами - у великій кількості помилок та довгому часі реакції, тому необхідно підтримувати баланс між точністю і процесивністю фермента. Зазвичай, чим довше ділянка, тим вища ймовірність помилок. Метод ПЛР був запатентований корпорацією Cetus, де працював Мулліс, скоро після його відкриття. Використання Taq-полімерази також було захищене патентами. Проте, відбулося кілька високопрофільних судових процесів щодо цього методу, зокрема невдалий судовий процес, ініційований компанією DuPont. Фармацевтична компанія Hoffmann-La Roche придбала права на патенти в 1992 році і зараз має всі права на ПЛР. Битва патентів на право використання фермента Taq-полімерази все ще продовжується в кількох юрисдикціях у всьому світі між компаніями La Roche і Promega. Цікаво, що компаніям вдалося продовжити права на ПЛР і Taq на час після закінчення початкового патенту 28 березня 2005 року.

Принцип дії

Необхідні компоненти

Малюнок 1: Типовий ампліфікатор для ПЛР



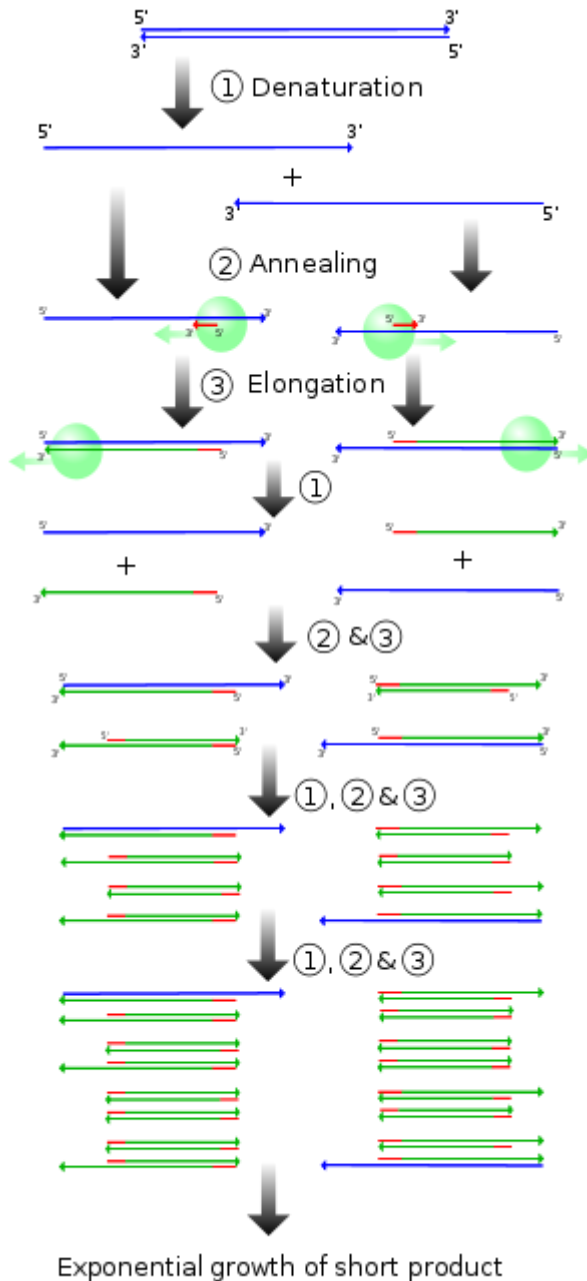
Метод заснований на багатократному виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів *in vitro* (в штучних умовах). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє задані умови, і лише в тому випадку, якщо він присутній в досліджуваному зразку.

За допомогою ПЛР зазвичай можуть бути ампліфіковані відносно короткі (до 10 kbp) ділянки ДНК з відомими кінцями, у окремих випадках можуть використовуватися ділянки до 40kbp. Для проведення найпростішої ПЛР потрібні такі компоненти:

ДНК-матриця, тобто фрагмент ДНК, що містить ту ділянку, яку потрібно ампліфікувати.
 Два праймери, комплементарні кінцям необхідного фрагменту.
 Термостабільна ДНК-полімераза.
 Дезоксинуклеотидтрифосфати (A, G, C, T).
 Буферний розчин.

ПЛР проводять в ампліфікаторі — приладі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання тестових пробірок із розчином, зазвичай з точністю не менше за 0,1 °С.

Малюнок 2: Схематичне зображення процесу ПЛР. (1) Денатурація при 94-96°C. (2) Відпал при ~65°C (3) Елонгація при 72 °C. На малюнку зображені чотири цикли



реакції.

Специфічність ПЛР базується на утворенні комплементарних комплексів між матрицею і праймерами (короткими синтетичними олігонуклеотидами довжиною 18—30 основ). Кожен з праймерів комплементарний одному з ланцюгів дволанцюгової матриці, обрамляючи початок і кінець ділянки, яка ампліфікується.

Після гібридизації матриці з праймером (відпал [5]), останній служить затравкою для ДНК-полімерази при синтезі комплементарного ланцюжка матриці (див. нижче).

Найважливіша характеристика праймерів — температура плавлення (T_m) комплексу праймер-матриця. Вона визначається, як температура, за якої половина нуклеотидів праймера гібридизована із матрицею. T_m можна приблизно визначити за формулою $T_m = 4(X) + 4(Y)$, де nX — кількість нуклеотидів X в праймері. Якщо праймер короткий і T_m мала, то праймер може виявитися частково комплементарним до інших ділянок матричної ДНК, що може призвести до появи неспецифічних продуктів. Верхня межа температури плавлення - оптимум дії полімерази, активність якої зазвичай падає при температурі, вищій за 80 °С. Тому ретельний дизайн праймерів — необхідна задача, яку слід провести перед тим як починати ПЛР.

При виборі праймерів бажано дотримуватися наступних критеріїв:

вміст GC ~ 40—60 %;

близькі T_m праймерів (відмінності не більш, ніж на 5 °С);

відсутність неспецифічних вторинних структур — шпилек[6] і димерів[7];

бажано, щоб на 3'-кінці був гуанін або цитозин.

Хід реакції:

Зазвичай при проведенні ПЛР виконується 20—35 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій (див малюнок 2):

Дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94—96 °С (або до 98 °С, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5—10 хв., щоб ланцюги ДНК розійшлися. Ця стадія називається денатурацією — руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами. Іноді перед першим циклом проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2—5 хв. для повної денатурації матриці і праймерів.

Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоби праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею. Ця стадія називається відпалом (англ. annealing). Температура відпалу залежить від праймерів і зазвичай вибирається на 4—5°С нижче за їх температуру плавлення. Час стадії — 0,5—2 хв.

ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюжок, використовуючи праймер як затравку. Це так звана стадія елонгації. Температура елонгації залежить від полімерази. Полімерази Taq і Pfu, що найчастіше використовуються, найбільш активні за 72 °С. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини фрагмента, який ампліфікують. Середня швидкість елонгації - 1000 пар основ за 1 хв. Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюжкові фрагменти. Ця стадія триває 10—15 хв.

Різновіди ПЛР:

Вкладена ПЛР (англ. Nested PCR) — застосовується для зменшення частки побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК усередині продукту першої реакції.

Інвертована ПЛР (англ. Inverse PCR) — використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити фланкуючі послідовності після вставки ДНК в геном. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять ряд розрізів ДНК рестриктазами з подальшим лігуванням. В результаті відомі фрагменти утворюються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити звичайну ПЛР.

ПЛР із зворотною транскрипцією (або ЗТ-ПЛР, англ. Reverse Transcription PCR, RT-PCR) — використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності з бібліотеки РНК. Перед звичайною ПЛР проводять транскрипцію молекули РНК за допомогою зворотної транскриптази і отримують комплементарну ДНК (кДНК). Цим методом часто визначають, де і коли експресуються дані гени.

Асиметрична ПЛР (англ. Assymetric PCR) — проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно один з ланцюжків початкової ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридизаційного аналізу. ПЛР проводиться за класичним сценарієм, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку.

Кількісна ПЛР (англ. Quantitative PCR, Q-PCR) — використовується для швидкого вимірювання кількості певної ДНК, кДНК або РНК в пробі.

Кількісна ПЛР в реальному часі — в цьому методі використовують флуоресцентні мічені реагенти для точного вимірювання кількості продукту реакції у міру його накопичення.

Touchdown ПЛР (англ. Touchdown PCR) — за допомогою цього методу зменшують вплив неспецифічної гібридизації праймерів на утворення продукту. Перші цикли проводять при температурі, вищій за температуру відпалу, потім кожні декілька циклів температуру знижують. За певної температури система пройде через смугу оптимальної специфічності праймерів до ДНК.

Метод молекулярних колоній (або «ПЛР в гелі», англ. Colony - PCR Colony) — поліакріламідний гель полімеризують зі всіма компонентами ПЛР на поверхні і проводять термоциклування. У точках, які містять ДНК, до якої підібрані праймери, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній.

Геліказно-залежна ампліфікація (англ. Helicase-dependent amplification) — подібна до звичайної ПЛР, але реакція проходить при постійній температурі. Для роз'єднання ланцюжків ДНК використовується геліказа замість теплової денатурації.

ПЛР із швидкою ампліфікацією кінців кДНК (англ. Rapid amplification of cDNA ends, RACE) — ампліфікація матричної РНК (мРНК) за допомогою відомого фрагмента усередині цієї молекули.

ПЛР довгих фрагментів (англ. Long-range PCR) — модифікація ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10 kbp і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких — Таq-полімераза з високою процесивністю (тобто полімераза здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга — ДНК полімераза з 3'-5' ендонуклеазною активністю. Друга полімераза необхідна для того, щоб корегувати помилки, внесені першою.

Випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) — використовується тоді, коли потрібно розрізнити близькі за генетичною послідовністю організми, наприклад, різні сорти культурних рослин, породи собак або близькоспоріднені мікроорганізми. У цьому методі зазвичай використовують один праймер невеликого розміру (20 — 25 bp). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру та ін.), вдається добитися задовільної відмінності картини ПЛР для двох організмів.

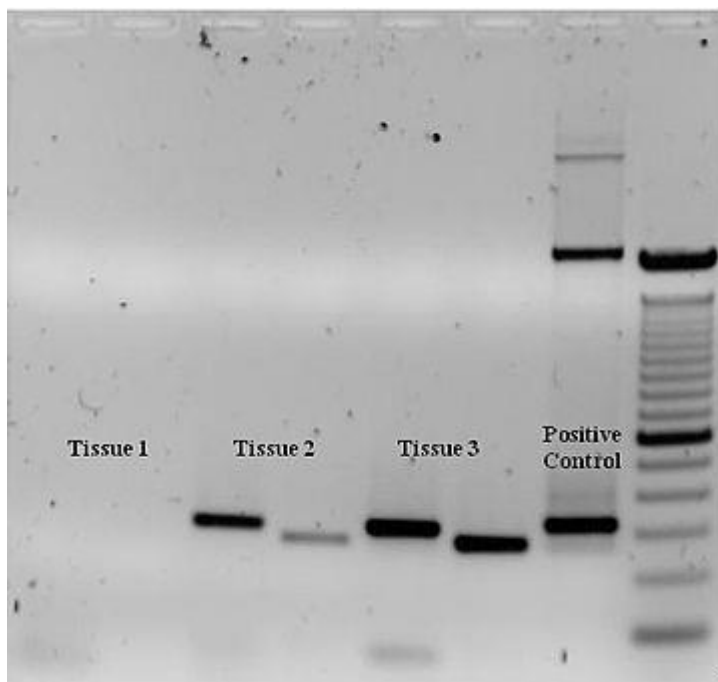
Мультиплексна ПЛР (англ. Multiplex PCR) — використання великого числа унікальних праймерів в одній реакції ПЛР для отримання кількох продуктів ПЛР різної довжини. Така реакція заміняє кілька окремих реакцій ПЛР, які вимагали би більшої кількості реагентів та часу. Температури відпалу кожного з наборів праймерів повинні бути оптимізовані, щоби вони могли правильно працювати в межах однієї реакції. Крім того, розміри ділянок ДНК, які ампліфікуються, повинні достатньо відрізнятися, щоб їх можна було розрізнити за допомогою гелевого електрофорезу.

Мультиплексна ампліфікація проб за допомогою лігування (англ. en:Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) дозволяє ампліфікувати кілька ділянок ДНК за допомогою однієї пари праймерів.

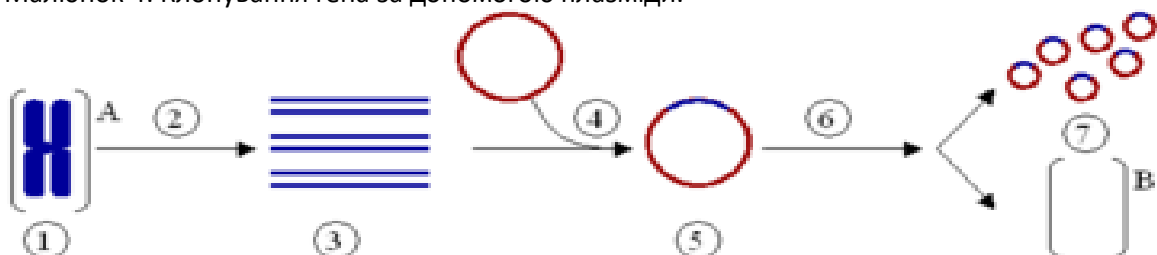
Якщо нуклеотидна послідовність матриці відома лише частково або невідома зовсім, можна використовувати вироджені праймери, послідовність яких містить вироджені позиції, в яких можуть розташовуватися будь-які нуклеотиди. Наприклад, послідовність праймера може бути такої: .ATN., де N заміняє собою А, Т або С.

Використання

Малюнок 3: Результати гелевого електрофорезу продуктів ПЛР, візуалізовані за допомогою етідиум броміда. Два набіра праймерів використовувалися для ампліфікації гена IGF з трьох різних зразків тканин. У зразку 1 (Tissue 1) ген відсутній, і не був ампліфікований, тоді як смуги у зразках 2 і 3 вказують на успішну ампліфікацію цього гену. У якості позитивного контролю використовується шкала ДНК, яка містить фрагменти ДНК різної довжини (стовпчик праворуч) для оцінки розміру продуктів реакції ПЛР.

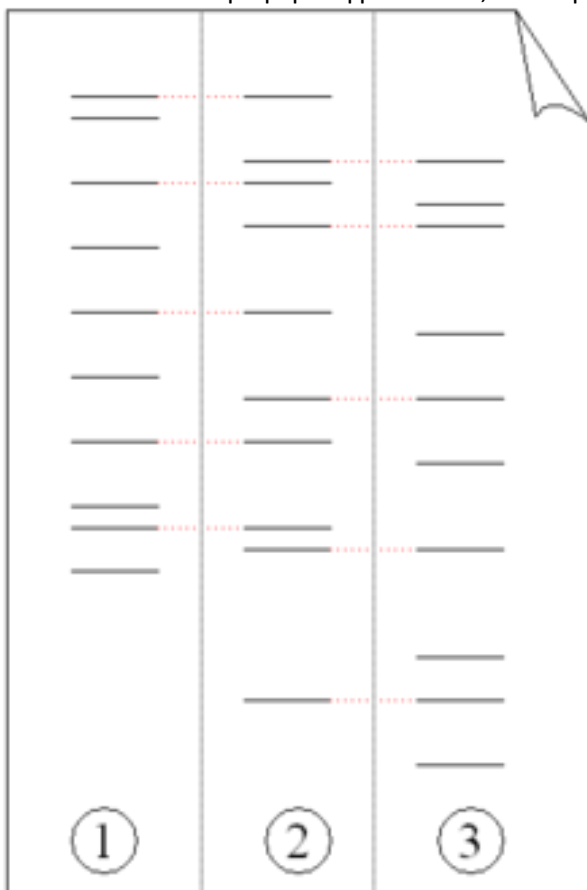


Малюнок 4: Клонування гена за допомогою плазміди.



Хромосомна ДНК організму А. (2) ПЛР. (3) Багато копій одного гену з організму А. (4) Вставлення гену в плазмиду. (5) Плазмідна з геном з організму А. (6) Вставлення плазмід в організм В. (7) Експресія гену з організму А в організмі В.

Малюнок 5: Елестрофорез фрагментів, ампліфікованих за допомогою ПЛР.



- (1) Батько.
- (2) Дитина.
- (3) Мати.

Дитина придбала деякі, але не всі, лінії своїх генетичних відбитків пальців від кожного із своїх батьків, створюючи новий унікальний набір.

Ізоляція генетичного матеріалу

Велика частина ефективності ПЛР знаходиться в його здатності легко ізолювати специфічні регіони послідовності ДНК з матеріалу цілого генома. Для багатьох методів потрібний резервуар молекул ДНК, ізольованих із специфічного фрагмента ДНК, і використання ПЛР зробило всі ці методи більш ефективними. Оскільки ПЛР також ампліфікує ізольований регіон, методи потребує дуже маленьких кількостей матеріалу для аналізу.

Секвенування ДНК і виявлення генетичних хвороб

Як тільки створений зразок, в якому всі молекули походять від єдиного регіону ДНК, можливо здійснити секвенування (встановлення послідовності) ДНК для визначення невідомої послідовності нуклеотидів фрагменту між двома праймерами. Один з праймерів ПЛР зазвичай використовується як якір для методу Зангера, найзагальнішого зараз методу секвенування. Цей метод зазвичай використовується для діагностики генетичних захворювань; доктор може підтвердити діагноз, спостерігаючи відмінності послідовності ДНК, які, як відомо, пов'язані з захворюванням.

Методи рекомбінації ДНК:

Ізоляція фрагмента ДНК дозволяє проведення методів рекомбінантної маніпуляції ДНК, які залучають вставку наданої послідовності ДНК до генетичного матеріалу іншого організму (зараз такі організми відомі як генетично змінені організми, ГЗО або ГМО). ПЛР часто використовується для ампліфікації гена, який потім може бути вставлений в

інший геном через відповідний процес рекомбінації або, звичайніше, вставлений у вектор (наприклад, плазмиду), який несе ДНК в цільовому організмі.

Використання в криміналістиці та встановлення батьківства

Метод генетичних відбитків пальців (англ. genetic fingerprinting) — метод, що використовується в криміналістиці для ідентифікації людини, порівнюючи її ДНК з ДНК в наданому зразку. ПЛР звичайно використовується для ампліфікації набору певних регіонів ДНК, про які відомо, що вони змінюються в довжині від людини до людини. Комбінація довжин всіх цих регіонів, які потім розділяються за допомогою гелевого електрофорезу, створює «генетичний відбиток пальців». Із застосуванням ПЛР теоретично потрібна лише одна молекула ДНК для певної ідентифікації, хоча у окремих випадках саме ця чутливість збільшує ризик помилок через можливе забруднення, і ампліфікацію в результаті ДНК з зовнішніх джерел. Існує кілька методів генетичних відбитків пальців, але всі вони звичайно використовують гелевий електрофорез, після чого зразок фарбується за допомогою етідіум броміда або інших фарбників, або спостерігається за допомогою гібридизації з пробамі ДНК за допомогою саузерн-блоттинга.

На практиці необхідний зразок генетичного матеріалу збирається з місця злочину — кров, слина, сперма, волосся тощо. Цей зразок порівнюють з генетичним матеріалом підозрюваного. Оскільки є невелика вірогідність, що у двох чоловік відбитки виявляться схожими, цей метод частіше використовується для доказу невинності підозрюваного.

Хоча «генетичні відбитки пальців» унікальні (за виключенням випадку однойцевих близнят), споріднені зв'язки все ж таки можна встановити, зробивши декілька таких відбитків (див. малюнок). Той же метод можна застосовувати, злегка модифікувавши його, для встановлення еволюційної спорідненості серед організмів.

Ампліфікація та вимірювання кількості ДНК

Оскільки ПЛР ампліфікує регіони ДНК, він може використовуватися для аналізу надзвичайно невеликих кількостей зразку. Крім того, кількість часу, потрібна для ампліфікації ДНК до наданого рівня, залежить від її кількості в початковому зразку, завдяки чому ПЛР може також використовуватися для визначення кількості ДНК.

Аналіз стародавньої ДНК

Використовуючи ПЛР, стає можливим проаналізувати ДНК, якій кілька тисяч років. Методи ПЛР були успішно використані на деяких стародавніх тваринах, наприклад мамонті віком у 40 тис. років та на людській ДНК з стародавніх гробниць, наприклад, єгипетських мумій.

Ідентифікація вірусної ДНК

Вірусні захворювання також можуть бути ідентифіковані за допомогою ПЛР. Використовуючи праймери, специфічні для даного вірусу, ПЛР може успішно ампліфікувати ДНК та виявити, чи присутній в ньому вірус. Оскільки ПЛР дуже чутливий, такий аналіз часто можливий скоро після інфекції, яка може відбутися від кількох днів до кількох місяців або навіть років до появи фактичних симптомів. Таке раннє виявлення надають лікарям істотну допомогу в лікуванні. Лікарі можуть також використовувати методи кількісної оцінки ДНК для визначення кількості вірусу («вірусний вантаж») в пацієнті.

Оцінка кількості ДНК і визначення експресії генів

Тому що кількість продукту, отриманого за допомогою ПЛР, залежить від кількості початкового матеріалу, ПЛР може використовуватися для оцінки кількості копій наданої послідовності, які присутні в зразку — техніка, особливо корисна для визначення рівнів експресії генів. У клітинах кожен ген експресується через виробництво матричної або транспортної РНК (тРНК), яка потім використовується для трансляції у білки, відповідні гену. Кількість РНК в клітині для даного гена показує, наскільки ген зараз активний.

Використовуючи зворотну транскрипцію для отримання ДНК, комплементарного мРНК (кДНК) і згодом використовуючи РЛР для ампліфікації цих молекул, можливо визначити рівень експресії гену.

Точніші вимірювання можливі, якщо кількість дволанцюжкової ДНК вимірюється після кожного циклу ПЛР, метод відомий як «кількісний ПЛР в реальному часі». До суміші додається фарбник, який становиться флуоресцентним при контакті з ДНК, і кількість ДНК може бути визначена по інтенсивності флуоресценції.

Однониткові конформації поліморфізму (SSCP), або одноланцюговий поліморфізм, визначається як різниця конформаційних одноланцюгових нуклеотидних послідовностей однакової довжини, як індукований відмінності в послідовності за певних експериментальних умовах. Ця властивість дозволяє розрізняти послідовностей за допомогою гель-електрофорезу, яка відокремлює різні конформації.

Змістовий модуль 5. Пренатальна діагностика природженої та спадкової патології.

Конкретні цілі.

- Знати сучасні можливості пренатальної діагностики.
- Знати методи пренатальної діагностики.
- Знати показання для інвазивної пренатальної діагностики.
- Знати строки для проведення скринінгу вагітних.
- Аналізувати результати біохімічного скринінгу.
- Знати показання для елімінації вагітності.

Тема 13. Методи пренатальної діагностики.

Студент повинен знати:

1. Сучасні можливості пренатальної діагностики.
2. Методи пренатальної діагностики.
3. Терміни для проведення скринінгу вагітних.
4. Аналіз результатів біохімічного скринінгу.
5. Показання до елімінації вагітності.
6. Історія розвитку допологової діагностики.
7. Пренатальна діагностика як метод профілактики.
8. Загальні показання до пренатальної діагностики.
9. Скринуючі методи пренатальної діагностики.
10. Організація медико-генетичної допомоги вагітним з високим генетичним ризиком.
11. Основні задачі пренатальної діагностики.
12. Неінвазивні методи пренатальної діагностики.

Короткий виклад теоретичного матеріалу.

Пренатальна діагностика природжених і спадкових хвороб - це комплексна галузь

медицини, яка швидко розвивається. Вона використовує й *ультразвукову діагностику* (УЗД), й *оперативну техніку* (хоріонбіопсію, амніо- і кордоцентез, біопсію м'язів і шкіри плоду), і *лабораторні методи* (цитогенетичні, біохімічні, молекулярно-генетичні).

Пренатальна діагностика має винятково важливе значення при медико-генетичному консультуванні, оскільки вона дозволяє перейти від вірогідного до однозначного прогнозування здоров'я дитини в родинах з **генетичним** обтяженням. У даний час пренатальна діагностика здійснюється в I і II триместрах вагітності, тобто в періоди, коли у випадку виявлення патології ще можна перервати вагітність. На сьогодні можлива діагностика практично всіх **хромосомних синдромів** і близько 100 **спадкових хвороб**, біохімічний дефект при яких встановлений вірогідно.

Питання про проведення *пренатального переривання вагітності* має ставитися тільки після оцінки наступних критеріїв

1. Хвороба повинна бути досить тяжкою, щоб було виправдане переривання вагітності.
2. Лікування хвороби плоду неможливе і незадовільне.
3. Родина, що консультиється, повинна бути згодна на переривання вагітності.
4. Існує точний тест для постановки пренатального діагнозу
5. Досить високий генетичний ризик несприятливого результату вагітності

При *організації і розвитку системи пренатальної діагностики* повинні виконуватися наступні умови

1. Діагностичні процедури повинні бути безпечні для здоров'я матері і плоду.
2. Частота ускладнень вагітності після пренатальної діагностики не повинна помітно підвищуватися зі спонтанним рівнем, тобто процедура не повинна підвищувати ймовірність втрати плоду відразу чи після її проведення у віддалений період
3. Лікарі, що володіють технікою пренатальної діагностики, повинні знати ймовірність постановки псевд-позитивних чи псевдонегативних діагнозів, іншими словами, повинні добре знати обмеження методу.
4. Пренатальна діагностика повинна включати два етапи: перший етап - виявлення жінок (точніше, родин) з підвищеним ризиком несприятливого в генетичному плані результату вагітності при медикогенетичному консультиванні чи первинному обстеженні усіх вагітних, у тому числі з використанням методів просіваючої діагностики; другий етап - власне пренатальна діагностика. Аналізи проводяться тільки жінкам, що мають фактори ризику.
5. Група фахівців з пренатальної діагностики (акушер-гінеколог, лікар-генетик, лікар-лаборант-генетик) повинні знати діагностичні обмеження методу не взагалі, а в їхній власній лабораторії.
6. Група фахівців повинна суворо дотримуватися стандартів для процедур і лабораторних аналізів, здійснювати поточний контроль якості роботи, а також мати статистику завершення вагітностей і розбіжностей діагнозів (контроль після абортів чи після народження).

Показання для пренатальної діагностики:

1. Вік матері визначений у 35 років.
2. Наявність у родині попередньої дитини з хромосомною патологією, у тому числі із **синдромом Дауна** (попередній анеусомік).
3. Перебудови батьківських **хромосом**.
4. Наявність у родині захворювань, **успадковуваних зчеплено зі статтю**.
5. Синдром фрагільної **X-хромосоми**.
- 6.. Гемоглобінопатії.
- 7.. Природжені помилки метаболізму.
8. Різні спадкові захворювання, що діагностуються методом зчеплення з **ДНК**-маркерами.
9. Дефекти нервової трубки.
10. Інші показання для цитогенетичної пренатальної діагностики.

Інвазивні методи дослідження в пренатальній діагностиці

Амніоцентез - прокол плодового міхура з метою одержання навколоплідної рідини і злущених клітин амніону плода. Діагностичне значення методу не викликає сумнівів. Ця процедура здійснюється на 15-18 тижнях вагітності. Ризик ускладнень вагітності при амніоцентезі становить 0,2 %. Амніоцентез роблять через очеревину під контролем УЗД, щоб не пошкодити плаценту. Також можливий піхвовий амніоцентез, але такий підхід застосовується рідко. З амніотичної порожнини забирають 8-10 мл рідини. З біохімічних показників рідини тільки концентрація альфа-фетопротеїну (АФП) є діагностично значимою. Рівень АФП істотно підвищується при аномаліях нервової трубки і дефектах

передньої черевної стінки. Основним джерелом діагностичного матеріалу при амніоцентезі є клітини. Їх обов'язково культивують (це триває 2-4 тижні) і для цитогенетичних, і для біохімічних досліджень. Тільки молекулярно-генетичні варіанти діагностики за допомогою полімеразної ланцюгової реакції не вимагають культивування клітин.

Кордоцентез, тобто взяття крові з пуповини, стали використовувати ширше після того, як цю процедуру почали здійснювати під контролем УЗД, тобто без фетоскопії. Процедуру проводять у термін з 18 по 22 тижні вагітності. Зразки крові є об'єктом для цитогенетичних (культивуються лімфоцити), молекулярно-генетичних і біохімічних методів діагностики спадкових хвороб.

Кордоцентез використовують для діагностики **хромосомних хвороб**, гематологічних спадкових хвороб (гемоглобінопатії, коагулопатії, тромбоцитопенії), імунодефіцитів, гематологічного статусу при резус-сенсibiliзації, внутрішньоутробних інфекцій. Процедура з першої спроби успішна в 80-97 % випадків. Перевага кордоцентезу в порівнянні з амніоцентезом полягає в тому, що кров є зручнішим об'єктом для дослідження, ніж клітини амніотичної рідини. Лімфоцити культивуються швидше (2-3 дні) і надійніше, ніж амніоцити. Біопсія тканин плода як діагностична процедура здійснюється в 2-му триместрі вагітності під контролем УЗД. Для діагностики тяжких спадкових хвороб шкіри (іхтіоз, епідермоліз) роблять біопсію шкіри плода. Далі проводиться патоморфологічне дослідження (іноді електронно-мікроскопічне). Морфологічні критерії наявності спадкових хвороб шкіри дозволяють поставити точний діагноз чи впевнено відкинути його.

Фетоскопія (введення зонду й огляд плода) при сучасній гнучко-оптичній техніці не складає великих труднощів. Однак метод візуального обстеження плода для виявлення природжених вад розвитку використовується рідко — тільки при особливих показаннях. Він використовується на 18-23-му тижнях вагітності. Справа в тому, що майже всі природжені вади розвитку, які можна побачити за допомогою оптичного зонда, діагностуються за допомогою УЗД. Зрозуміло, що процедура УЗД простіша і безпечніша. Для фетоскопії потрібне введення зонда в амніотичну порожнину, що може викликати ускладнення вагітності. Викидні відзначаються в 7-8 % випадків фетоскопії.

Неінвазивні методи дослідження в пренатальній діагностиці.

Основним неінвазивним методом пренатальної діагностики є **ультразвукове дослідження** (УЗД), яке необхідно проводити усім вагітним. Ультразвукове сканування плода проводять не менше двох разів під час вагітності кожній жінці. Перший огляд не пізніше 15-16 тижня, другий - у 25-26 тижнів. Якщо є більш визначені показання для УЗД (наприклад, передбачувана редукція кінцівок плода), то його проведення можна починати з 13-14 тижня. УЗД використовується для виявлення затримки росту ембріона чи плода, починаючи з 6-8-го тижнів вагітності. Метод можна застосовувати і як просіюючий, і як уточнюючий. Це дозволяє попередити народження 1-3 дітей (з 1000 новонароджених) із серйозними природженими вадами розвитку, що складає приблизно 30 % усіх дітей з такою патологією.

Біохімічний скринінг патології плода при вагітності

Скринінговими називають методи дослідження, які можуть застосовуватися для масового обстеження завдяки своїй безпеці і простоті проведення.

Біохімічний скринінг - це визначення в крові деяких специфічних речовин («маркерів»), які змінюються при певних патологіях. При вагітності проводиться біохімічний скринінг на вади розвитку нервової трубки (головного і спинного мозку) та хромосомні аномалії (синдром Дауна та синдром Едвардса).

Біохімічний скринінг не дозволяє поставити діагноз. Він лише з тією чи іншою мірою вірогідності дозволяє виявити жінок з високим або низьким ризиком патології. Щоб поставити діагноз, потрібні додаткові методи дослідження (УЗД, інвазивна діагностика - кордоцентез, амніоцентез).

Показання для проведення біохімічного скринінгу. Деякі лікарі вважають, що біохімічний скринінг треба рекомендувати всім вагітним жінкам, так як від патології плоду ніхто не застрахований. ВООЗ рекомендує всім вагітним проводити скринінг другого триместру («потрійний тест»).

Однак є й інша точка зору, що дане дослідження повинне проводитися тільки жінкам, які мають фактори ризику. В даний час у нашій країні безкоштовно направляються на біохімічний скринінг тільки такі жінки, хоча існує наказ, що всі жінки повинні бути спрямовані в другому триместрі на аналіз АФП і ХГЛ. Це можна пояснити тим, що в більшості лікарень і консультацій відсутня можливість для визначення необхідних показників, доводиться направляти жінок в МГЦ, а він може дати обмежена кількість напрямів.

До факторів ризику відносять:

1. Вік жінки (більше 35 років);
2. Наявність в сім'ї дитини з хромосомними аномаліями;
3. Близькоспоріднений шлюб;
4. Прийом на початку вагітності деяких ліків, протипоказаних при вагітності (наприклад, цитостатиків або антиепілептичних препаратів);
5. Тривала загроза переривання вагітності;
6. 2 і більше викидня раніше;
7. Відхилення від норми результатів УЗД;
8. Опромінення одного з членів подружжя перед зачаттям.

Біохімічний скринінг першого триместру («Подвійний тест»)

Біохімічний скринінг першого триместру проводиться в 11-13 тижнів вагітності. При цьому визначаються 2 показники: ХГЛ і РАРР-а (білок асоційований з вагітністю). Визначаються не тільки абсолютні значення показників, але і МОМ. МОМ це відхилення показника від середнього значення для даного терміну, він вимірюється як співвідношення отриманого і середнього значень показників. Чим ближче МОМ до одиниці, тим ближче значення показника до середнього.

Різко підвищує достовірність методу оцінка даних в сукупності з результатами УЗД. За УЗД оцінюються візуалізація (видимість) носової кістки (в нормі її видно в 11 тижнів у 98% дітей, при синдромі Дауна носову кістку в 11 тижнів не видно у 70% дітей) і товщина комірцевого простору (у нормі не перевищує 3 мм). Це дуже важливі показники, оцінити які можна лише в першому триместрі. Якщо за результатами подвійного тесту та УЗД виявляється високий ризик патології, рекомендується інвазивна діагностика - біопсія хоріона. При невеликих відхиленнях рекомендується проведення скринінгу другого триместру.

Ефективність виявлення синдрому Дауна та синдрому Едвардса при проведенні скринінгу першого триместру становить 60%, помилково негативні результати близько 13%. Якщо оцінювати тест в сукупності з результатами УЗД то знижується кількість хибно-негативних результатів і підвищується ефективність виявлення до 85%. Вади розвитку нервової трубки за результатами подвійного тесту не виявляються.

Біохімічний скринінг другого триместру («Потрійний тест»)

Біохімічний скринінг другого триместру проводиться в 15-20 тижнів, оптимально проведення в 16-18 тижнів.

У цьому терміні визначається три показники: АФП, ХГЧ і НЕ (некон'югованих естріол). Також як і в першому триместрі визначаються рівень цих речовин і МОМ.

Іноді в другому триместрі обмежуються лише визначенням АФП і ХГЛ, або взагалі тільки АФП. Діагностична цінність тесту при цьому значно знижується.

При синдромі Дауна зазвичай АФП знижений, а ХГЛ підвищений. При синдромі Едвардса АФП нормальний, а ХГЛ низький. При дефектах розвитку нервової трубки підвищений АФП, інші показники в нормі. Підвищення АФП може бути також при

дефектах заращення передньої черевної стінки і при аномаліях нирок у плода. Діагностично значимим може вважатися тільки підвищення АФП в 2,5 і більше разів.

Даний тест дозволяє виявити до 90% випадків вад розвитку нервової трубки. При синдромі Дауна та синдромі Едвардса відхилення в показниках потрійного тесту спостерігаються лише в 70% випадків, тобто 30% помилково негативні результати. Хибнопозитивних результатів при цьому близько 10%.

В ідеалі тест повинен оцінюватися в сукупності з результатами УЗД.

При проведенні скринінгу і першого, і другого триместру, з урахуванням результатів УЗД, ефективність виявлення дефектів нервової трубки становить 98%, а синдромів Дауна та Едвардса 93%, а хибнопозитивні результати зустрічаються лише в 1-2% випадків.

При виявленні високого ризику жінку направляють на кордоцентез.

Що впливає на результати тесту. Як у першому, так і в другому триместрі на результати тесту можуть впливати багато факторів. При оцінці ризику вони обов'язково повинні враховуватися.

-1. Багатоплідна вагітність. При цьому зазвичай показники підвищено, ризик розрахувати неможливо, проведення біохімічного скринінгу не доцільно;

2.ЕКО;

3. Вага жінки. При великій масі тіла показники можуть бути підвищені, у худеньких навпаки знижені;

4.Вплинути на результати аналізів можуть також шкідливі звички, особливо куріння при вагітності, захворювання матері при здачі аналізу (наприклад, застуда), цукровий діабет у матері.

Іноді має місце неправильне визначення терміну вагітності, і біохімічний скринінг проводиться в не відповідні терміни. Може бути неправильне зазначення терміну вагітності на напрямку, отже і ризик розраховується неправильно.

Високим рівнем ризику вважається ризик 1:380-1:250. Жінкам з таким рівнем ризику необхідно більш детальне обстеження - повтор УЗД, додаткове опитування, що дозволяє виявити фактори, які могли вплинути на результат. Лише частина з цих жінок спрямовуються на кордоцентез.

При цьому потрібно порівняти ризик за результатами біохімічного скринінгу і ризик кордоцентеза. Ризик викидня або передчасних пологів при кордоцентезе становить приблизно 2%, тобто 1:50

Тема 14,15. Пренатальна ультразвукова діагностика природжених вад розвитку. Біохімічні скринінгові програми

Студент повинен знати:

- 1.Стратегію ультразвукової пренатальної діагностики.
- 2.Рівні обстеження вагітних.
- 3.Обсяг обстежень, які проводяться на кожному рівні.
- 4.Терміни проведення ультразвукового скринінгу.
- 5.Показання для направлення вагітних на другий та третій рівні обстеження.
- 6.Сучасні можливості пренатальної ультразвукової діагностики природжених вад розвитку.
- 7.Оптимальні строки для діагностики природжених вад розвитку.
- 8.Використання доплерографії.
- 9.Показання до елімінації вагітних.

Короткий виклад теоретичного матеріалу

Обстежені плоди умовно поділяються на 3 групи:

I. група - плоди з вадами розвитку, які несумісні з життям (численні вроджені вади розвитку, тяжкі вади центральної нервової системи, летальні остеохондродисплазії) чи із хромосомною патологією.

II. група - плоди з вадами розвитку, що частково чи повністю коригуються (деякі легкі вади розвитку серця, нирок, шлунково-кишкового тракту).

III. група - плоди, стан здоров'я яких викликає протилежні думки у фахівців, бо у всьому світі ще не визначена тактика ведення вагітності при деяких захворюваннях плоду, а летальність, за даними різних авторів, сягає від 25% до 85%. До цієї групи плоди відносяться нерідко не на основі об'єктивних показань, а виходячи із суб'єктивного ставлення лікаря до даного плоду та його патології.

	1 триместр	2 триместр
1. Термін обстеження	10 – 13 тижнів	15 – 20 тижнів
2. Маркери материнської сироватки	PAPP-A, β-бета-ХГ	АФП, ХГ (double-test), або АФП, ХГ + вільний естріол (triple-test)
3. Розрахунок індивідуального генетичного ризику	Спеціалізована комп'ютерна програма	Спеціалізована комп'ютерна програма
4. Параметри для розрахунку індивідуального ризику	Вік жінки, вага, анамнез, рівень PAPP-A та β-ХГ та ультразвукові маркери – комірцевий простір і кістка носа	Вік жінки, вага, анамнез, рівень біохімічних маркерів II триместру

Термін гестації	Метод діагностики	Матеріал
До імплантації (в разі ЕКО)	Молекулярно-цитогенетичний аналіз ДНК-діагностика	Одиничні бластомери Полярні тільця
9 – 13 тижнів	Цитогенетичний аналіз ДНК-діагностика Біохімічний аналіз Морфологічний аналіз	Ворсини хоріона
14 – 20 тижнів	Цитогенетичний аналіз ДНК-діагностика Біохімічний аналіз Морфологічний аналіз	Ворсини хоріона Амніотична рідина Клітини амніотичної рідини
21 – 24 тижні	Цитогенетичний аналіз ДНК-діагностика Біохімічний аналіз Морфологічний аналіз	Ворсини плаценти Амніотична рідина Клітини амніотичної рідини Пуповинна кров
Після 25 тижнів	Проводиться за акушерськими показаннями для визначення стану плода в разі резус-конфлікту, цукрового діабету тощо.	
В пізні терміни вагітності	Цитогенетичний аналіз для діагностики каріотипу плода з метою розв'язання питання щодо тактики ведення пологів за показаннями з боку плода	
Перший триместр	Перспективне генетичне дослідження в периферичній крові матері ДНК плода для виявлення анеуплоїдій.	

Значення УЗД в акушерстві важко переоцінити. До впровадження ультразвукової візуалізації було неможливо точно визначити розміри плоду, уточнити термін вагітності, досліджувати структуру плаценти, діагностувати вроджені каліцтва. Іноді з метою діагностики каліцтв застосовували рентгенівське дослідження, але про те, щоб піддавати йому всіх вагітних, не могло бути й мови внаслідок несприятливого впливу випромінювання на внутрішньоутробний плід. Тому можна без перебільшення сказати, що революційним поліпшенням перинатальних результатів, що має місце протягом останніх років, медицина зобов'язана ультразвукової діагностики в акушерстві.

Іноді можна почути питання: здорові люди не ходять на УЗД. Чи потрібно воно при нормально протікає вагітності? Відповідь може бути тільки одна: звичайно, треба. По-перше, тому, що профілактичний підхід завжди краще, тим більше в акушерстві. Адже внутрішньоутробний плід сам не піде в кабінет УЗД і не скаже: "Чось я останнім часом погано себе почуваю ..."

Ось кілька аргументів, які говорять на користь необхідності УЗ-контролю за перебігом вагітності:

- Пороки розвитку плоду в 90% випадків розвиваються у абсолютно здорових батьків, без будь-яких факторів ризику. Тобто своєчасно виявляються такі вади тільки лише при УЗД, зробленому в профілактичних цілях;
- Можуть мати місце значні вади розвитку плода при зовні благополучному перебігу вагітності;
- Клінічне обстеження (тобто пальпація зовнішніми прийомами) не є достовірною при встановленні багатоплідної вагітності, не кажучи вже про контроль нормального (асоційованого) внутрішньоутробного розвитку близнят;
- Вагітні з низьким розташуванням плаценти і передлежанням плаценти, як правило, не здогадуються про це до тих пір, поки не почалась кровотеча;
- До 50% жінок, які стверджують, що точно знають термін вагітності (в т.ч. і "по зачаттю") помиляються більше ніж на 2 тижні, а саме ці 2 тижні можуть виявитися дуже важливі. Наприклад, лікарська тактика при загрозі передчасних пологів у 34 або 36 тижнів буде різною.

Коли потрібно пройти УЗД?

Коли потрібно вперше відвідати кабінет УЗД при вагітності? Краще зробити це в терміні до 15 тижнів. Саме в цей термін можна:

- Підтвердити наявність вагітності;
- Уточнити розташування плідного яйця (в порожнині матки або позаматкової);
- Точно визначити термін вагітності. Саме на ранніх термінах можливо уточнення гестаційного віку плоду з точністю до 2 - 3 днів. Надалі ці межі будуть ширшими;
- Виявити багатоплідної вагітність;
- Виключити т.зв. помилкову вагітність при наявності утворень у малому тазу.

Наступний УЗ-дослідження при вагітності, як правило, призначають в терміні 18 - 22 тижні вагітності. Це оптимальний період для:

- діагностики вроджених вад плоду.
- визначення місця розташування плаценти і виявлення її передлежання.

Наступне "планове" УЗД при вагітності найчастіше рекомендують в терміні 32 - 34 тижнів. При дослідженні в цей термін можливо:

- встановити наявність синдрому затримки розвитку плоду;
- виявити деякі види патології плода, які не могли бути виявлені на більш ранніх термінах;
- виявити передлежання плаценти і визначити положення плоду;

- визначити кількість навколоплідних вод, що має важливе значення для діагностики деяких видів страждання плоду;

Сказане не означає, що при вагітності можливе лише триразове УЗ-дослідження. Це швидше мінімальний обсяг обстеження, допустимий при абсолютно фізіологічному протіканні вагітності. При вагітності, що протікає з тими чи іншими відхиленнями, програму УЗ-досліджень необхідно розширити. Наприклад: певний інтерес іноді представляє ехоскопія безпосередньо перед пологами, коли можна визначити передбачувану вагу плоду і уточнити його положення і передлежання. Часто лікарі призначають серію досліджень з інтервалом у 2 - 3 тижні для уточнення темпів росту плода, коли є підозра на його внутрішньоутробне страждання.

Тримірне УЗД плода



Протягом останнього десятиліття закордоном та в останні два роки в нашій країні все більшої популярності, як у пацієнтів, так і у лікарів набуває новий метод ультразвукової діагностики — тримірний ультразвук, який в діагностичному плані значно розширює можливості, залишаючись таким же безпечним та надійним методом візуалізації плода.

Заради справедливості слід сказати, що двовимірний режим ультразвукового апарату дає можливість спеціалістам отримати максимальну кількість інформації, необхідної для з'ясування стану матері і дитини. Але сьогодні, на жаль, далеко не кожний медичний заклад, навіть приватний, володіє парком апаратів, що відповідають сучасним вимогам діагностики. Так як методика двовимірного ультразвуку застосовується і вдосконалюється вже впродовж десятиріч, спеціалістами чітко розроблено методи стандартизації даних, отриманих при ультразвуковому дослідженні.

Тривимірна ультразвукова діагностика дає додаткову, розширену інформацію, особливо для діагностики вад розвитку кінцівок, обличчя, хребта, м'яких тканин. Тому у нашій клініці під час проведення УЗД ми поєднуємо цих два методи УЗД, що є найбільш оптимальним варіантом для отримання найточнішої інформації.

Крім медичних аспектів однією із беззаперечних переваг тривимірної діагностики є можливість батьків познайомитись зі своєю майбутньою дитиною, адже малюка можна побачити не у вигляді незрозумілих чорних крапок та ліній, а у вигляді об'ємного зображення в реальному часі, що вперше дає можливість побачити плід, окремі частини тіла, личко і все це записати на DVD, формуючи відеоархів дитини. Побачивши дитину в тривимірному зображенні, молоді батьки просто захоплюються нею і сприймають вже як повноцінну особистість.

До речі, дуже змінюється ставлення і старших дітей до майбутнього братика чи сестрички, якщо вони побували разом із мамою на прийомі у спеціаліста ультразвукової діагностики.

З використанням усіх видів кольорової та імпульсної доплерографії, що дозволяє оцінювати структуру та розміри органів, патологічних утворень та тік крові в них, за допомогою черезшкірних та порожнинних датчиків на апараті професійного класу.

Пацієнт може сам контролювати обстеження на додатковому моніторі. При бажанні проводиться відеозапис, фото.

Показання до елімінації вагітності:

- бажання жінки не народжувати дитину;
- гіпертонічна хвороба;
- тяжкі захворювання серця;
- контактування вагітної з інфекційно-хворими, наприклад хворими на краснуху;
- патологія щитоподібної залози;
- вади плоду, несумісні з життям.

Теми 16, 17. Інвазивні методи пренатальної діагностики. Методологія проведення інвазивних пренатальних методів дослідження.

Студент повинен знати:

- 1.Методи інвазивної пренатальної діагностики,терміни їх проведення.
- 2.Показання та протипоказання для проведення інвазивної пренатальної діагностики.
- 3.Можливі ускладнення внаслідок інвазивної діагностики.
- 4.Умови проведення інвазивної діагностики.
- 5.Методика проведення біопсії хоріона,кордоцентеза,плацентоцентеза,амніоцентеза.

Короткий виклад теоретичного матеріалу.

Інвазивні методи дослідження в пренатальній діагностиці.

Інвазивні діагностичні методи (ІДМ): аспірація ворсин хоріона (біопсія хоріона), пункція плаценти, пуповини або амніотичної порожнини з метою отримання біологічного матеріалу для подальших досліджень (цитогенетичних, молекулярних, біохімічних). Найбільш часто застосовуються трансабдомінальна аспірація ворсин хоріона, амніоцентез і кордоцентез, які дозволяють досягти найбільшої ефективності при відносно малих економічних затратах.

Лікувальні інвазивні методи: операції з метою пренатальної корекції деяких вад розвитку плоду, а також втручання, спрямовані на лікування деяких захворювань плоду (анемії).

Запам'ятайте:

Всі інвазивні втручання проводяться під ультразвуковим контролем .

Будь-яке внутрішньоматкове втручання пов'язане з ризиком переривання вагітності:

-необхідно ретельно оцінити ризик народження дитини з ВНЗ і ризик втрати вагітності після ІДМ;

-протягом 10-14 днів після обстеження із застосуванням ІДМ переривається у середньому 2,5% вагітностей: частота ускладнень залежить від виду втручання, терміну вагітності, досвіду лікаря;

-найменший ризик наголошується при амніоцентезе: 0,2-2,0%, найбільший - при кордоцентезе: до 5,4%;

-показники перинатальних втрат при ІДМ не перевищують показники втрати плодів серед усіх вагітних популяції.

Показання (після консультації лікаря-генетика):

-вік вагітної більше 35 років;

-обтяжений анамнез: народження дитини з ХА або моногенної патологією;

-наявність сімейної хромосомної транслокації або ідентифікованою генної мутації;

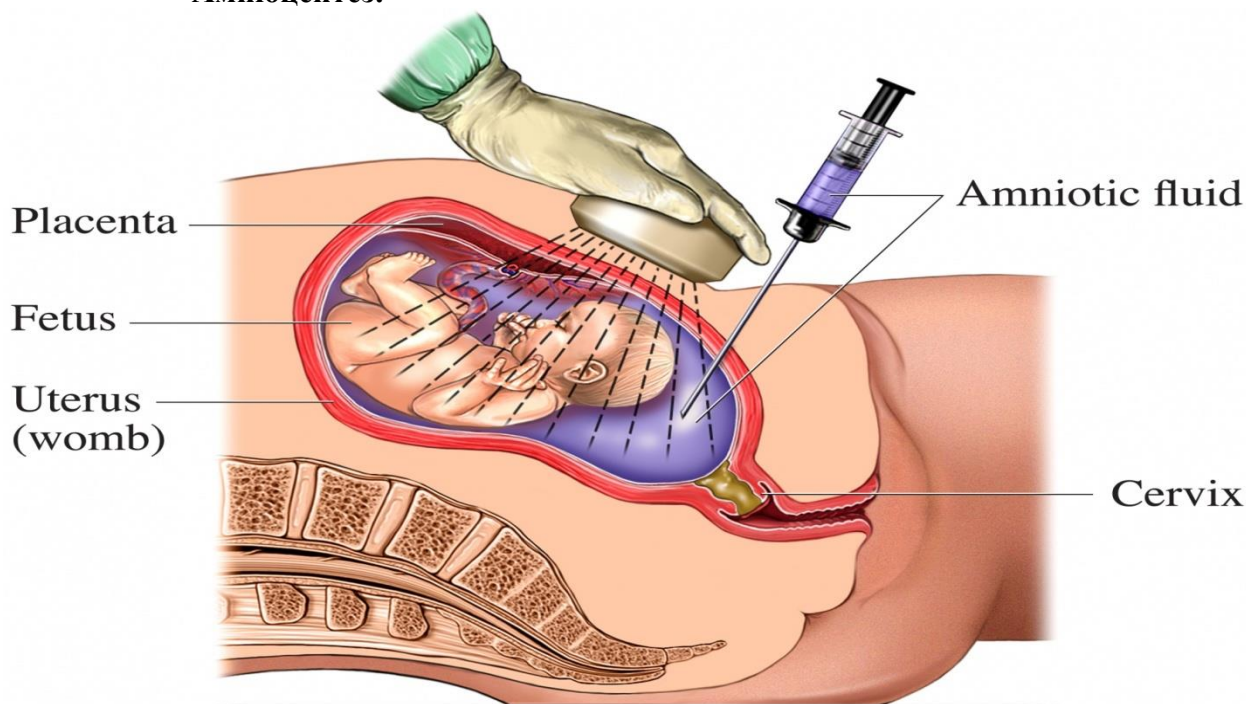
-мати з наявністю будь спадкової хвороби, пов'язаної з Х-хромосоною;

-будь-який батько з наявністю спадкового порушення обміну речовин;

-вагітність після трьох або більше мимовільних абортів;

-зміни, виявлені при вагітності: ехографічні та біохімічні маркери ХА.

Амніоцентез:



Ранній амніоцентез проводиться у строки 9-14 тижнів супроводжується більш високим ризиком самовільного аборту в порівнянні з абдомінальною біопсією хоріона; малоефективний для пренатальної діагностики, тому що в АЖ міститься мало клітин придатних для культивування, яке вимагає більш 40 днів. При цьому успішний результат може бути отриманий не більш ніж в 40% випадків.

Амніоцентез в терміни 14-18 тижнів (генетичний амніоцентез): ризик мимовільного аборту становить не більше 0,5-0,7%; можливі помилки внаслідок клітинного мозаїцизму: близько 2,5% клітинних культур АЖ дають другу клітинну культуру; вимір в АЖ змісту АФП і ацетилхолінестерази (при АФП більше 2 МОМ) підвищує точність діагностики дефектів нервової трубки плода до 97% при 0,5% помилково-позитивних результатів.

Аспірація ворсин хоріона:

Зразки ворсин хоріона містять матеріал трофобласта з повним хромосомним набором плода; каріотип плода може бути визначений безпосередньо з ворсин хоріона прямим методом, що є найбільш швидким і економічно вигідним; можливо і культивування клітин, частіше всього разом з прямим аналізом.

Показання до аспірації ворсин хоріона:

- народження в сім'ї дитини з хромосомними захворюваннями;
- транслокації і інверсії хромосом у одного з подружжя;
- захворювання, зчеплені зі статтю;
- деякі моногенні захворювання;
- ультразвукові маркери хромосомних аберацій.

Протипоказання:

- запальні захворювання з підвищенням температури тіла;
- кров'янисті виділення з статевих шляхів;
- попередні лапаротомії та операції на матці і шийці матки;
- множинні вузли міоми матки;
- III-IV ступінь чистоти піхви.

Оптимальний термін процедури - 9-11 тижнів.

Методика:

Доступ трансцервікальним або трансабдомінальний. Трансцервікальної маніпуляції може перешкоджати генітальний герпес, рубці на шийці матки, поліпи, гіперретрофлексія матки. Найчастіше застосовують трансабдомінально аспірацію. УЗД проводиться до і під час процедури. Спеціальна голка 20G з мандреном. Потрібно не більше 10-20 мг матеріалу, що становить менше 1% функціональної тканини хоріона. Процедура проводиться амбулаторно з подальшим спостереженням за пацієнткою у денному стаціонарі протягом 2-х годин.

Отриманий матеріал.

Ворсин хоріона складається з: зовнішнього шару - гормонально активного синцитіотрофобласту, середнього шару - цитотрофобласту, внутрішнього шару - мезодермального. Цитотрофобласт має високий мітотичний індекс з багатьма спонтанними мітозами, придатними для негайного хромосомного аналізу. Хромосомні препарати придатні для аналізу вдається отримати від 95 до 98%.

Ускладнення:

- ❖ кровомазання або кровотеча: у 1-4% при трансабдомінальному доступі і 20% при трансцервікальній;
- ❖ ретрохоріальними гематома;
- ❖ розрив плодових оболонок в 0,3-0,5% випадків;
- ❖ частота самовільних абортів за вітчизняними даними складає в середньому 3,3%: при трансцервікальній доступі - 4,8%, при трансабдомінальному - 2,2%;
- ❖ частота самовільних абортів за зарубіжними даними становить 0,6-0,8%;
- ❖ внутрішньоматковій інфекції: 0,2% - 0,5%;
- ❖ плодово-материнська трансфузія.

Недоліки методу:

- ✓ можливість забруднення взятого зразка материнської децидуальної тканиною;
- ✓ наявність в отриманому матеріалі мозаїцизму і псевдомозаїцизма: 1% і 0,4% відповідно.

Плацентоцентез - аспірація тканини плаценти.

Показання:

Ті ж, що і для біопсії хоріона.

Методика:

Здійснюється в II триместрі під контролем УЗД з використанням голки 18-20 G з мандреном. Маса аспірату повинна становити не менше 20-50 мг.

Переваги :

Перед біопсією хоріона: виключається негативний вплив на морфо-і органогенез плода; місце взяття аспірату розташоване значно далі від децидуальної оболонки, ніж при аспірації хоріона, тому рідше спостерігається забруднення зразків материнськими клітинами; у II триместрі можливий ретельний УЗ-контроль за станом плоду, що, в деяких випадках, дозволяє відмовитися від маніпуляції при наявності протипоказань і знизити кількість ускладнень; можна використовувати при маловодді; прямий метод отримання хромосомних препаратів з плаценти значно швидше за інших, і результат може бути відомий в день забору матеріалу, що дозволяє прийняти швидке рішення при виявленні аномалій розвитку плоду під час УЗД; успішний забір матеріалу з подальшим цитогенітичним або ДНК-аналізом становить 99%.

Ускладнення:

Ті ж, що при аспірації ворсин хоріона. Частота самовільних абортів при плацентоцентезі трохи нижче: 0,9-2,2%.



Кордоцентез :

Взяття крові з судин пуповини.

Можливості:

Пренатальное каріотипування, діагностика моногенних захворювань, внутрішньоутробного інфікування, дослідження кислотно-основного стану, гематологічних та біохімічних показників плоду.

Переваги:

- ✓ кров у порівнянні з іншим біологічним матеріалом дає значно більше інформації про стан і розвиток плоду;
- ✓ при пренатальному каріотипування отримання цитогенетичної відповіді можливо вже через 48-72 години, так як лімфоцити крові плода мають здатність до швидкого поділу;
- ✓ виявлення всіх особливостей будови хромосом, тому що при високій мітотичній активності лімфоцитів є можливість вивчення великої кількості метафазних пластинок і застосування різних методів диференційованого фарбування хромосом, що не завжди є при вивченні препаратів хоріона;
- ✓ на відміну від крові плоду, істинної плодної тканини, клітини хоріона і амніону є похідними позазародкові ектодерми і, в деяких випадках, мають набір хромосом, відмінний від клітин плоду.

Показання :

Діагностичний кордоцентез:

- ✓ Швидке каріотипування:
 - ✓ вади розвитку плоду;
 - ✓ ехографічні маркери хромосомних аберацій;
 - ✓ мозаїцизм, виявлений при дослідженні вод / плаценти;
 - ✓ безрезультатність попереднього цитогенетичного аналізу.
- Традиційні показання:
- ❖ вік вагітної більше 35 років;
 - ❖ народження в анамнезі дитини з хромосомною патологією;
 - ❖ хромосомна транслокація в одного з подружжя;
 - ❖ можливість ХА за даними сироваткових маркерів крові матері.
- Діагностика моногенних захворювань плоду:
- ✓ метаболічні порушення;
 - ✓ ферментопатії;
 - ✓ вроджені захворювання крові.
- Діагностика внутрішньоутробних інфекцій:
- токсоплазмоз;
 - цитомегаловірус;
 - краснуха;
 - парвовірус В19;

- вітрянка (Варіцелла).
5. Алоїмунізації і аутоімунізація:

резус-конфлікт;

ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура.

6. Вивчення внутрішньоутробного стану плоду:

кислотно-основний стан крові плоду

Лікувальний кордоцентез:

- внутрішньоутробні переливання препаратів крові при анемії
- внутрішньоутробне введення ліків

Протипоказання:

Абсолютні: Не існує.

Відносні:

- загроза переривання вагітності;
- гострі запальні процеси будь-якої локалізації;
- ожиріння;
- багатоводдя і маловоддя;
- множинна міома матки.

Оптимальний термін. Друга половина II триместру вагітності: у середньому в 24 (20-29) тижня, що обумовлено діаметром судин пуповини, який в ці терміни досягає оптимальних для кордоцентеза розмірів.

Методика:

Пункція пуповини проводиться спінальною голкою (з мандреном) довжиною від 9 до 16 см діаметром від 20 до 25G під контролем ультразвуку. Можливе застосування спеціальних голок покритих складом, який поліпшує візуалізацію голки на екрані. Бажаним є пунктирувати вільну петлю пуповини за методикою "вільна рука". Можлива пункція кореня пуповини, однак у цьому випадку легко одержати змішану кров. При цитогенетичних дослідженнях кров забирають у шприц, промитий гепарином. Матеріал для ДНК-діагностики вимагає розчину EDTA.

Для вірусологічних аналізів потрібна сироватка крові, тому додавання спеціальних розчинів не потрібно.

Проведення пренатального обстеження вимагає від 1 до 4 мл крові в залежності від виду подальших досліджень, що складає від 4 до 16% загального обсягу фетоплацентарної крові на початку II триместру вагітності. У більшості випадків процедура триває не більше 5-7 хвилин. З першої спроби кров отримують у 63-87% випадків, в досвідчених руках частота успіху з першої спроби досягає 92-97%.

Ускладнення:

Транзиторна брадикардія - уражень серцебиття до 100 ударів і менше в хвилину. спостерігається від 1,5 до 13,2%; частіше виникає у плодів з ВЗРП, анемією, неімунною водяною; як правило, триває трохи більше хвилини і відновлюється самостійно, без будь-яких медикаментозних втручань.

Кровотеча з місця пункції. відзначається в середньому в 31,3 (29-62)%; частота зростає при збільшенні тривалості процедури; в 78-86% випадків кровотеча продовжується менше хвилини, буває незначними і самостійно припиняється; мінімально реєстрований обсяг крововтрати становить 0,25 мл, максимальний - до 15 мл; у вагітних з резус-негативною кров'ю потрібно профілактика ізосенсибілізації шляхом введення анти-D-імуноглобуліну.

Гематоми пуповини. частота не перевищує 0,5%; мають невеликі розміри і не впливають на перинатальні наслідки.

Запальні ускладнення (хоріоамніоніт). частота становить 0,6-2,9% безпосередньо після процедури; в 28-40% випадків переривання вагітності, пов'язаного з кордоцентез,

згодом виявляються запальні зміни в плодовому яйці; протягом декількох днів після інвазивного втручання можливе проведення профілактичної антибактеріальної терапії.

Переривання вагітності. настає частіше протягом 10-14 днів після процедури; частота переривання, безпосередньо пов'язаного з кордоцентез, становить 2% -2,5%, переривання, що з'явилася через 2 тижні після процедури, - до 1,5%; перинатальні втрати складають не більше 2-2,5%; найбільш високі перинатальні втрати реєструються у плодів з аномаліями розвитку (13,1%) і з затримкою розвитку (8,9%); в 23% випадків причиною переривання вагітності є хоріоамніоніту, в 15% - важка форма плацентарної недостатності та затримка розвитку плода, в 30% - підвищена скорочувальна активність матки, у 32% - безпосередню причину встановити не вдається; частота перинатальних втрат підвищується зі збільшенням числа спроб проведення кордоцентеза.

Додаток

Медико-генетичні аспекти сім'ї

Медико-генетичне консультування - спеціалізована медична допомога - найбільш розповсюджена форма профілактики спадкових хвороб. Генетичне консультування - складається з інформування людини про ризик розвитку спадкового захворювання, передачі його нащадкам, про діагностичні та терапевтичні дії.

Досвід роботи медико-генетичних консультацій показує, що велике число звернень пов'язане з питанням прогнозу нащадків, з оцінкою генетичного ризику. Генетичний ризик, що не перевищує 5 %, розцінюється як низький, до 20 % - як підвищений і понад 20 % - як високий.

Консультування з приводу прогнозу нащадків можна розділити на дві великі групи: проспективне і ретроспективне. Проспективне консультування -це найбільш ефективний вид профілактики спадкових хвороб, коли ризик народження хворої дитини визначається ще до настання вагітності чи на ранніх її етапах. У цьому випадку подружжя, направлене на консультацію, не має хворої дитини, але існує певний ризик її народження, що ґрунтується на даних генеалогічного дослідження, анамнезу чи перебігу даної вагітності. Ретроспективне консультування - це консультування щодо здоров'я майбутніх дітей після народження в родині хворої дитини.

Завдання медико-генетичного консультування:

1. Встановлення точного діагнозу природженого чи спадкового захворювання.
2. Визначення типу успадкування захворювання в даній родині.
3. Розрахунок величини ризику повторення захворювання в родині.
4. Пояснення змісту медико-генетичного прогнозу тим людям, що звернулися за консультацією.
5. Диспансерне спостереження і виявлення групи підвищеного ризику серед родичів індивіда зі спадковою хворобою.
6. Пропаганда медико-генетичних знань серед лікарів і населення.

Показання для медико-генетичного консультування:

1. Народження дитини з природженими вадами розвитку.
2. Встановлена чи підозрювана спадкова хвороба в родині.
3. Затримка фізичного розвитку чи розумова відсталість у дитини.
4. Повторні спонтанні аборти, викидні, мертвонародження.
5. Близькоспоріднені шлюби.
6. Вік матері старше 35 років.
7. Несприятливі впливи факторів зовнішнього середовища в ранній термін вагітності (інфекційні захворювання, особливо вірусної етіології; масивна лікарська терапія; рентген-діагностичні процедури; виробничі шкідливості).
8. Несприятливий перебіг вагітності.

