



Тема: Современные методы ДНК-
диагностики наследственных болезней

Выполнила: Табусова А.С.
Группа: ФА14-002-1
Проверила: Какишева Г.Т.

До недавнего времени диагностика моногенных наследственных болезней основывалась исключительно на особенностях фенотипического проявления заболевания. Только при некоторых наследственных болезнях обмена веществ диагностику проводили, определяя уровень измененных метаболитов или даже измененного фермента. Фенотипический уровень диагностики иногда был достаточным для решения некоторых проблем клинической генетики, например для выбора тактики лечения клинически сходных, но генетически весьма гетерогенных заболеваний, таких как нервно-мышечные заболевания или пигментная дистрофия сетчатки и т.д.



Наиболее адекватные методы, обеспечивающие точную диагностику моногенных заболеваний, основаны на исследовании ДНК в районе определенных генов. Несмотря на то, что молекулярно-генетические методы, как правило, весьма сложны, трудоемки и дорогостоящи, данные, полученные в процессе ДНК-диагностики намного точнее и информативнее данных других анализов. Известно, что ДНК остается неизменной на протяжении всей жизни организма и одинакова во всех ядерных клетках, что позволяет использовать для анализа практически любые клетки организма, полученные на разных стадиях онтогенеза.



Таким образом, с помощью ДНК-диагностики можно решать следующие задачи, которые часто не удастся решить другими методами:

- подтверждение клинического диагноза или дифференциальная диагностика у пациента;
- пресимптоматическая диагностика - когда клинические признаки заболевания с поздним дебютом отсутствуют;
- пренатальная диагностика по ДНК плодного материала (ворсины хориона, клетки амниотической жидкости, кровь плода);
- преимплантационная диагностика по ДНК клеток дробящейся яйцеклетки, оплодотворенной *in vitro*.

Молекулярно-генетические методы проводят в несколько этапов.

Первый этап всех методов – получение образцов ДНК или РНК. Для этого используют каплю крови, лейкоциты, культуры фибробластов, соскоб эпителия со слизистой оболочки, волосяные луковицы. Выделенная ДНК одинаково пригодна для проведения различных вариантов и может долго сохраняться в замороженном состоянии.

Второй этап молекулярно-генетических методов является накопление (амплификация) нужных фрагментов ДНК. Его обеспечивает полимеразная цепная реакция (ПЦР) в invitro.

Метод амплификации (умножение числа копий определённого фрагмента ДНК) с помощью ЦПР позволяет в течение короткого времени размножить определённую последовательность ДНК в количестве, превышающем исходную в миллион раз.

Следующий этап молекулярно-генетической диагностики является рестрикция ДНК на фрагменты. Рестрикция ДНК (разрезание, разрывание) производится с помощью рестриктаз, относятся к группе бактериальных эндонуклеаз.

Разделение фрагментов ДНК обеспечивается методом электрофореза на агарозном или полиакриламидном геле. В процессе электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определённое положение в геле.

После обработки геля этидия бромидом, который связывается с ДНК, проводят ультрафиолетовое облучение и обнаруживают участки свечения. Существуют и другие методы окраски геля и выявления фрагментов ДНК.

Пресимптоматическая диагностика является принципиально новой возможностью, позволяющей в ряде случаев осуществлять эффективное превентивное лечение (например, в случае болезни Вильсона-Коновалова). Но даже в тех случаях, когда эффективное лечение заболевания отсутствует, получение информации о наличии или отсутствии патологического гена для членов семей со случаями наследственного заболевания имеет большое морально-психологическое значение и служит важнейшим фактором для принятия многих жизненно важных решений, связанных с планированием семьи и деторождения, выбора работы и т. д.

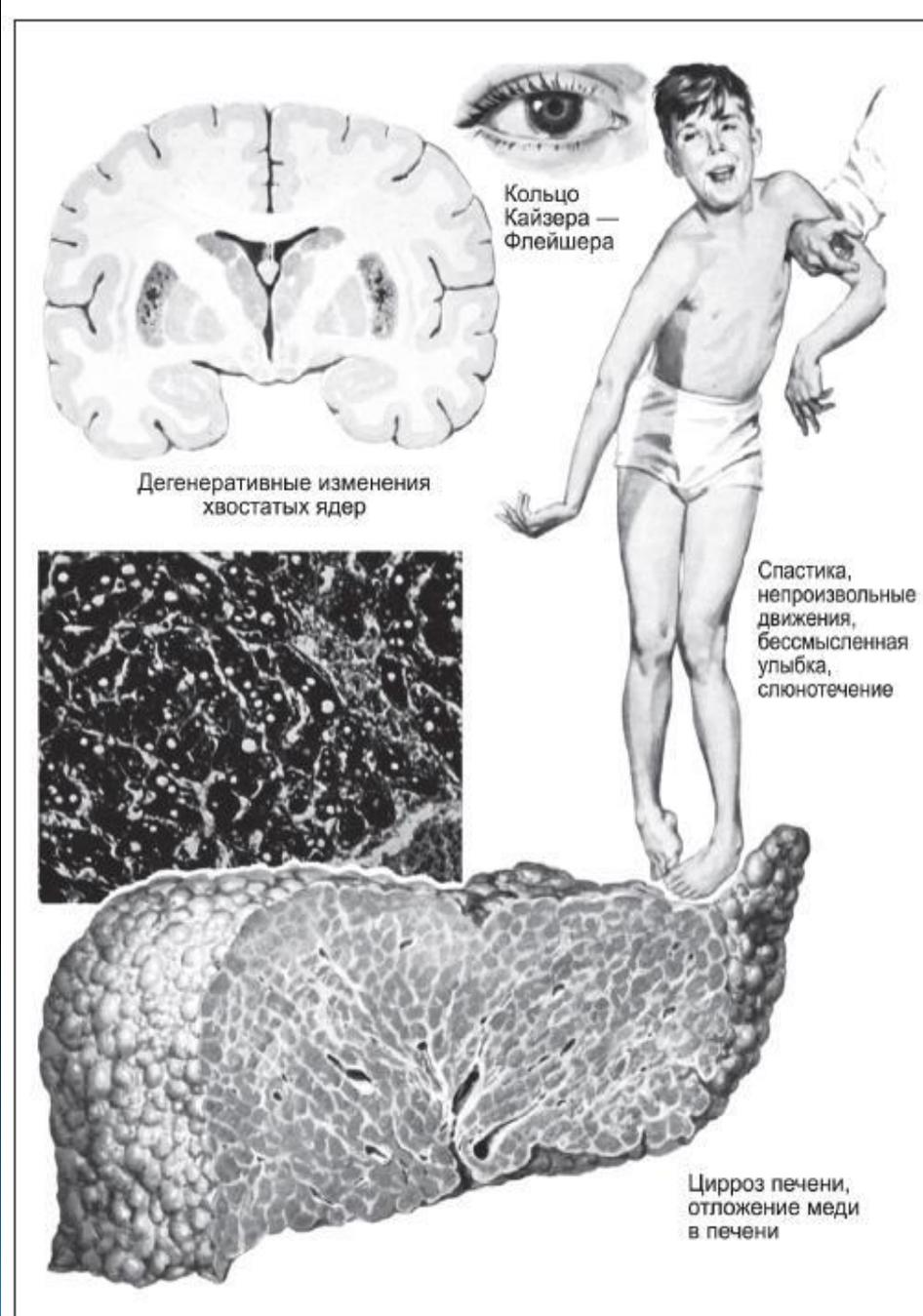
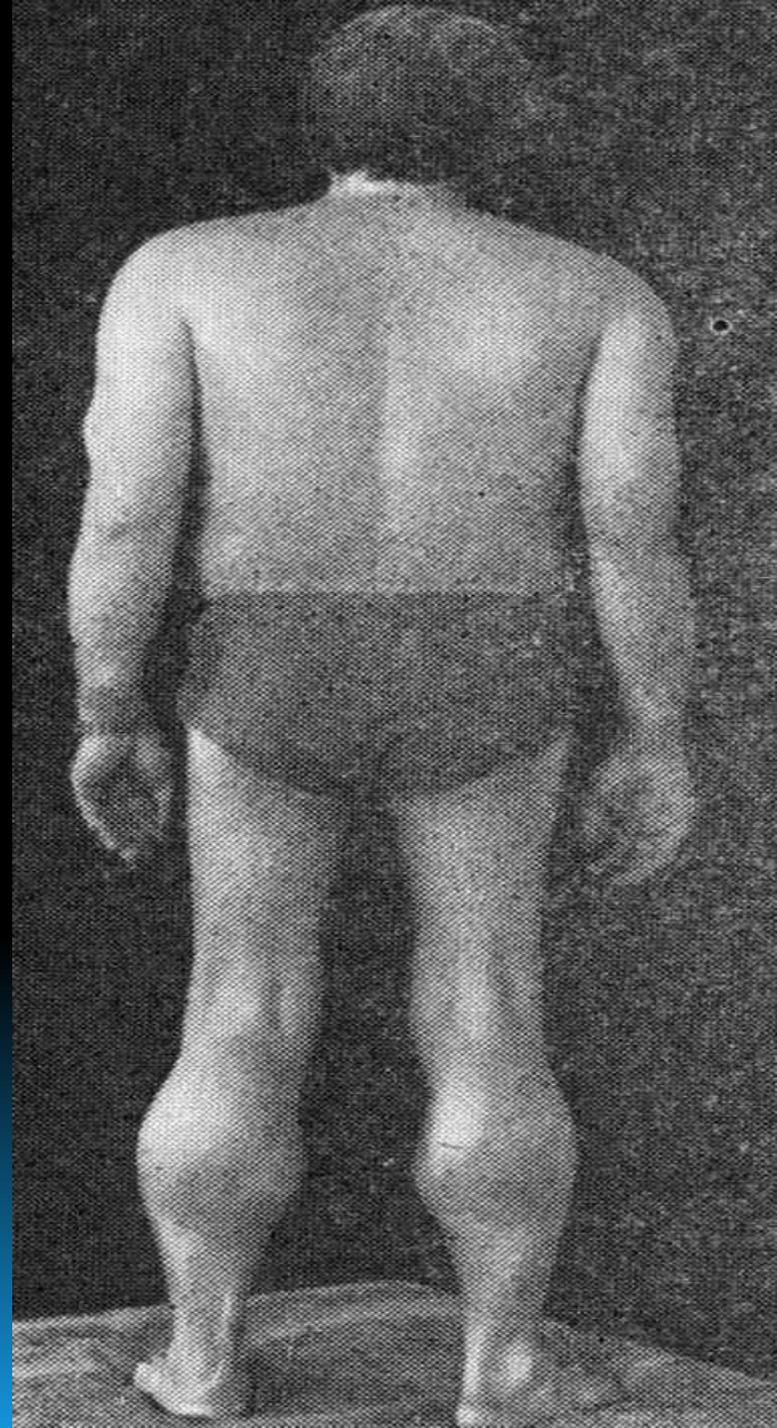


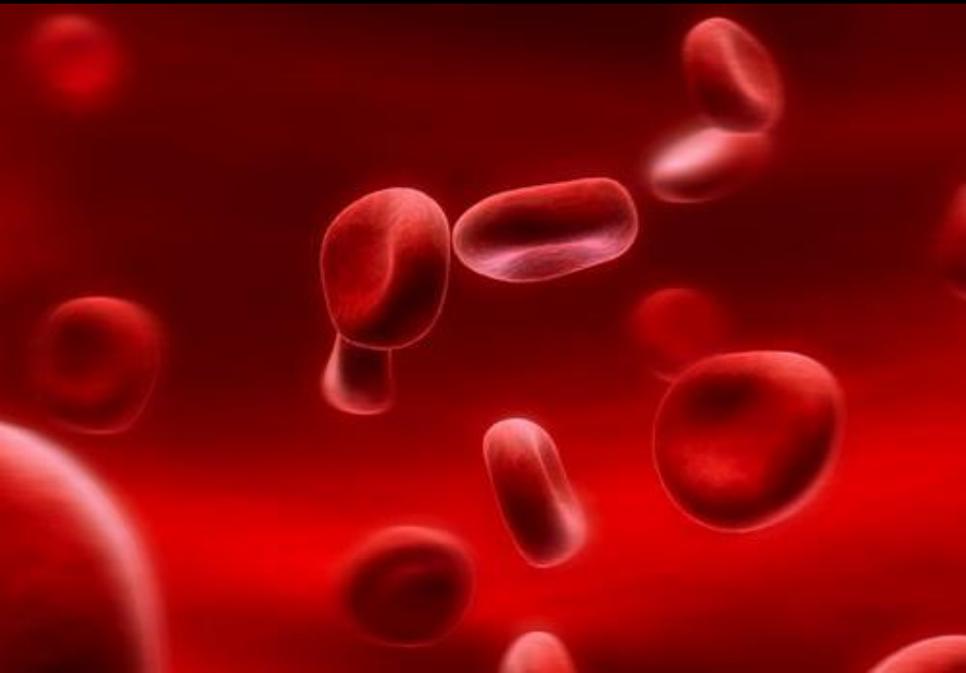
Рисунок 3. Главные органы-мишени и неврологические проявления болезни Вильсона — Коновалова (по F. Netter, 2001)

Наиболее важной является пренатальная диагностика, которая позволяет предотвратить рождение больных детей с тяжелыми наследственными болезнями, такими, как миодистрофия Дюшенна, муковисцидоз, миотоническая дистрофия, и позволяет семье, имеющей больного ребенка с наследственным заболеванием, родить здорового ребенка. По сути пренатальная диагностика является единственным эффективным средством профилактики для многих наследственных болезней.





С помощью методов ДНК-диагностики можно также определить носительство поврежденного гена для женщин в случае X-сцепленных заболеваний (миодистрофия Дюшенна, гемофилия А и В и др.). Женщина-носительница, как правило, является клинически здоровой, однако ее сыновья с вероятностью 0,5 будут больны. Для женщин-носительниц необходимо рекомендовать пренатальную диагностику, в то время как женщины-неносительницы не нуждаются в дальнейшем генетическом консультировании.



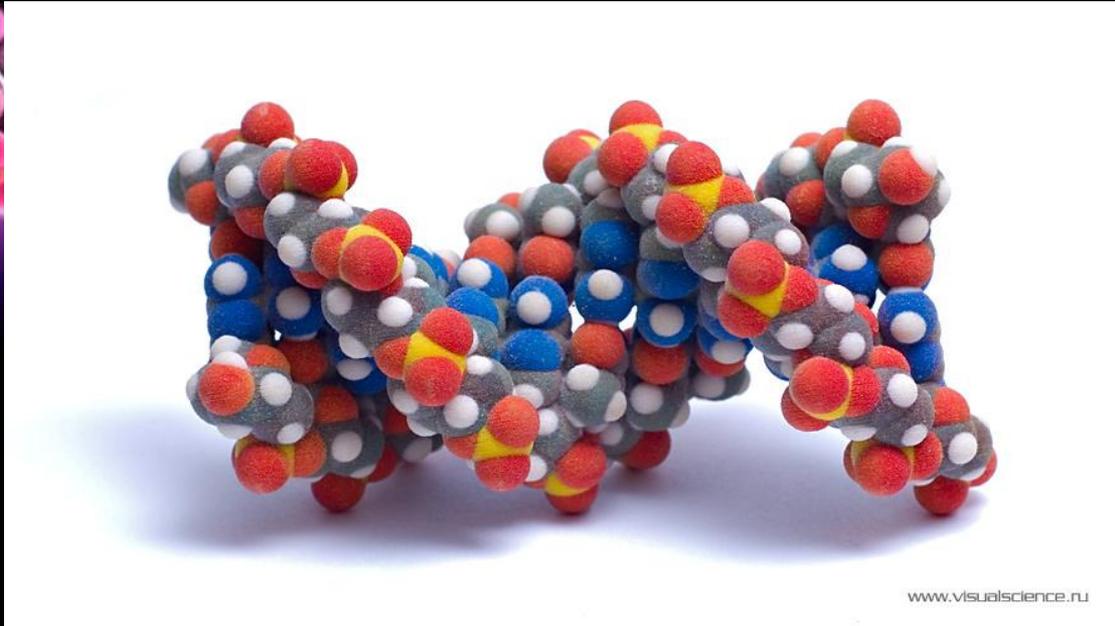
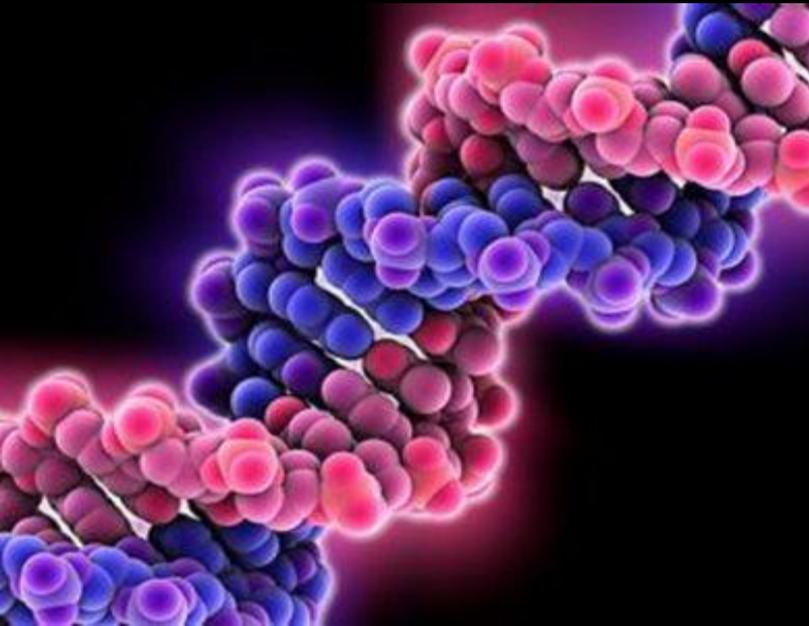
Предметом ДНК-диагностики может быть как исследование гена с целью выявления мутаций (прямой подход ДНК-диагностики), так и анализ сегрегации заболевания в определенной семье с полиморфными участками ДНК (маркерными локусами), тесно сцепленными с поврежденным геном {косвенный подход ДНК-диагностики). Прямая и косвенная ДНК-диагностика основана на методах, позволяющих идентифицировать небольшой, но строго определенный фрагмент ДНК человека. Обычно для этого используют блот-гибридизацию либо амплификацию с последующим анализом полученных образцов ДНК при помощи электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях или радиоавтографии.

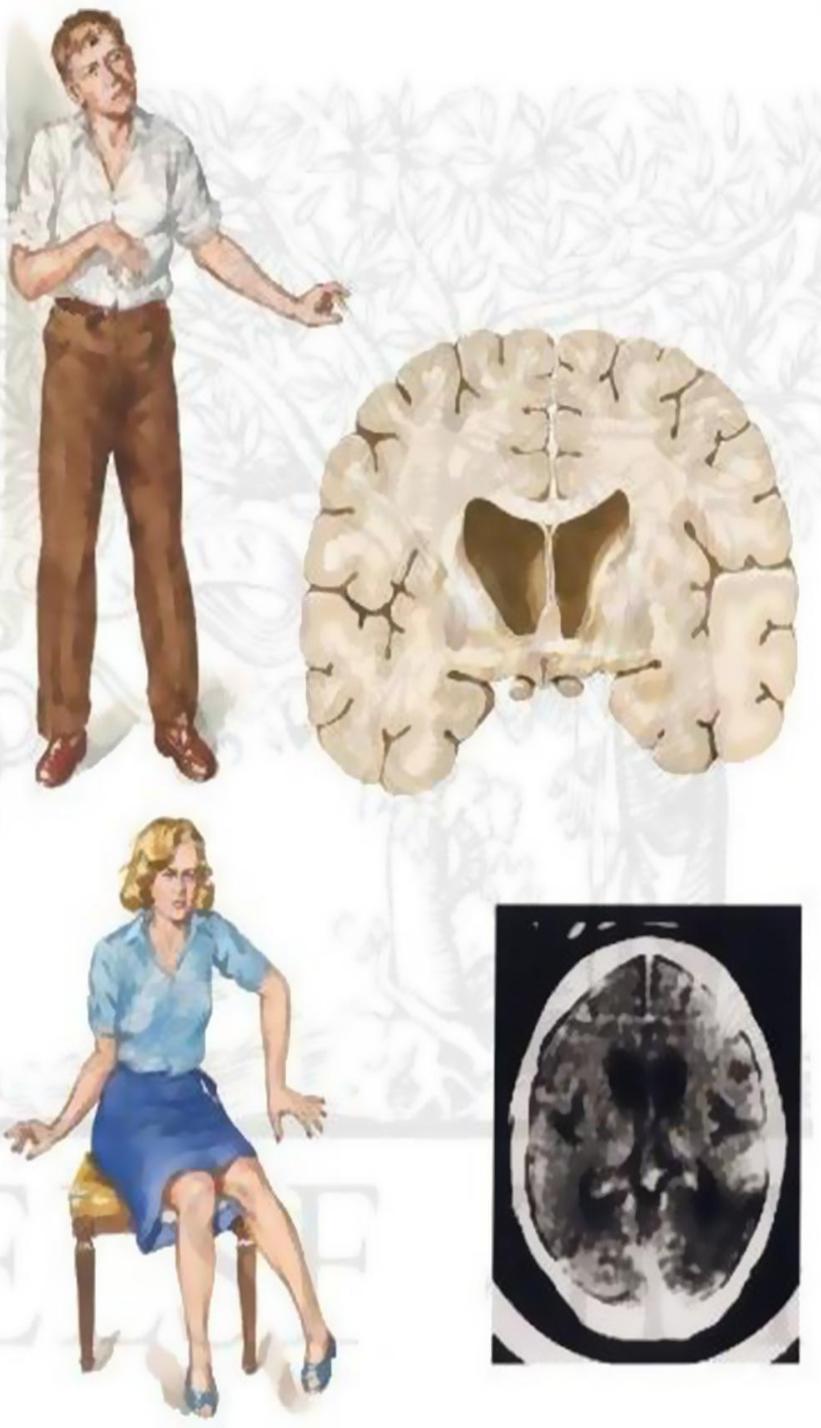
С помощью **прямых методов** выявляются нарушения в первичной нуклеотидной последовательности ДНК (мутации и их типы). Прямые методы отличаются точностью, достигающей почти 100 %. Однако на практике указанные методы могут применяться при определенных условиях:

- 1) известной цитогенетической локализации гена, ответственного за развитие наследственного заболевания,
- 2) должен быть клонированным ген заболевания и известна его нуклеотидная последовательность.



Целью прямой диагностики является идентификация мутантных аллелей (нарушения в первичной нуклеотидной последовательности ДНК, мутации и их типы). Высокая точность метода прямой ДНК-диагностики в большинстве случаев не требует ДНК-анализа всех членов семьи, так как выявление мутации в соответствующем гене позволяет почти со 100-процентной точностью подтвердить диагноз и определить генотип всех членов семьи больного ребенка, включая гетерозиготных носителей.





Недостатком метода прямой ДНК-диагностики является необходимость знания точной локализации гена и спектра его мутаций.

Методы прямой ДНК-диагностики показаны для таких заболеваний, как фенилкетонурия (мутация R408W), муковисцидоз - (наиболее частая мутация delF508), **хорея Гентингтона** (экспансия тринуклеотидных повторов-CTG-повторы) и др.

Однако к настоящему времени гены многих заболеваний не картированы, неизвестна их экзонно-интронная организация, и многие наследственные болезни отличаются выраженной генетической гетерогенностью, что не позволяет в полной мере использовать прямые методы ДНК-диагностики. Поэтому информативность метода прямой ДНК-диагностики широко варьирует. Так, при диагностике хореи Гентингтона, ахондроплазии она составляет 100 %, при фенилкетонурии, муковосцидозе, адреногенитальном синдроме - от 70 до 80 %, а при болезни Вильсона-Коновалова и миопатии Дюшенна/Бекера — 45-60 %. В связи с этим используются косвенные методы молекулярно-генетической диагностики наследственных болезней.

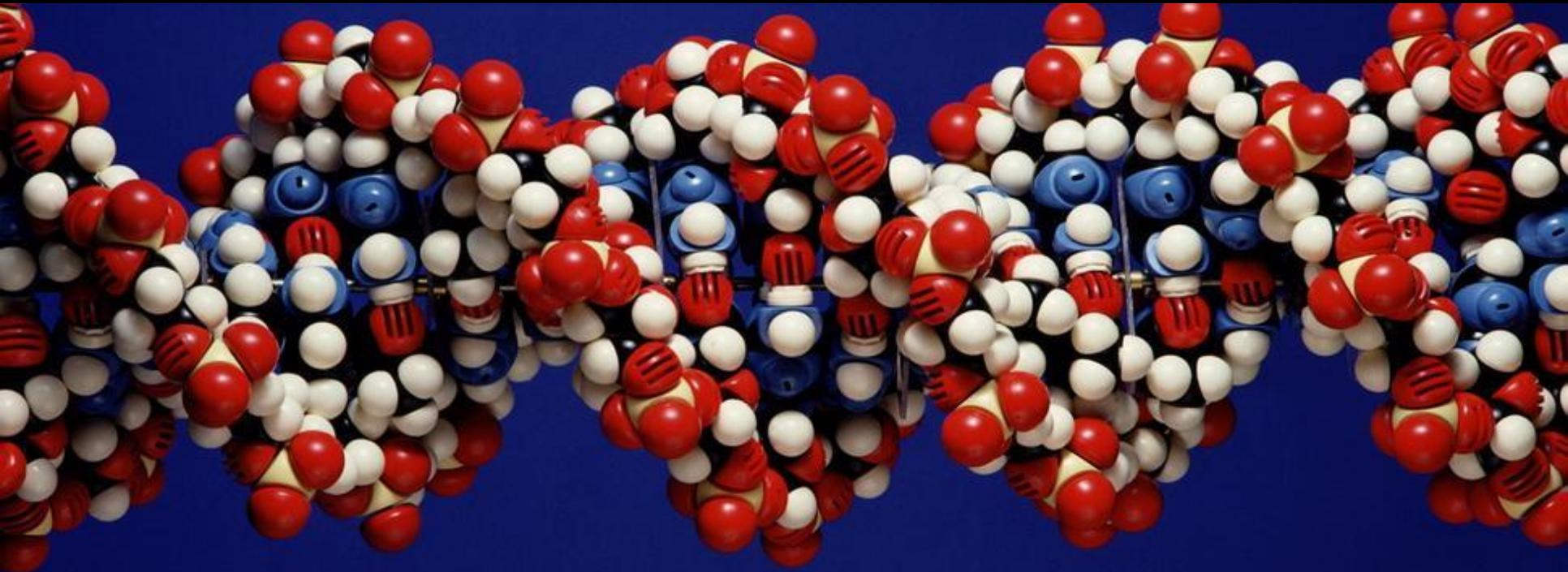
Косвенные методы ДНК-диагностики основаны на анализе сцепления с исследуемым геном определенного полиморфного локуса (маркера), с помощью которого можно производить маркировку как мутантных, так и нормальных аллелей и проанализировать их передачу в поколениях, т.е. среди родственников обследуемого лица. Это особенно важно при решении вопроса о пренатальной (дородовой) диагностике наследственного заболевания.



При использовании косвенных методов ДНК-диагностики следует помнить — чем теснее сцепление между маркерным локусом и мутантным геном, тем точнее диагноз. Чтобы свести до минимума ошибку диагностики, необходимо по возможности использовать внутригенные маркеры или использовать два маркерных локуса, фланкирующих мутантный аллель.

Таким образом, косвенная ДНК-диагностика проводится в следующих случаях:

- 1) когда ген не идентифицирован, а лишь картирован на определенной хромосоме,
- 2) 2) когда методы прямой ДНК-диагностики не дают результата (например, в силу большой протяженности гена или широком спектре мутационных изменений,
- 3) 3) при сложной экзонно-интронной организации гена.



Косвенные методы ДНК-диагностики могут использоваться в пренатальной диагностике практически для всех моногенных заболеваний. Однако для этого необходимо иметь знания о том, что локус является высокополиморфным и находится вблизи от мутантного гена или внутри него. Поэтому для диагностики требуется обследование как можно большего числа родственников (в первую очередь родители—дети), чтобы проследить путь передачи маркеров потомству. Это повышает информативность выбранного маркера.



Прямые методы		Косвенные методы	
преимущества	недостатки	преимущества	недостатки
Возможны при сомнительном диагнозе	Требуют знания гена	Не требуют знания гена и мутации в нем	Требуют абсолютной уверенности в диагнозе
Возможны при мультилокусном заболевании	Не всегда информативны	Информативны для всех семей	Применимы только для монолокусных заболеваний
Возможна беспробандная диагностика			Обязателен семейный анализ