

**АО «Медицинский Университет Астана»
Кафедра: внутренних болезней**

Молекулярно-генетические исследования в ревматологии

Выполнила: Амангелдиева А.

Группа: 785 ВБ

Проверила: Мейрамова Г. Б.

Астана – 2018

Методы генетических исследований

гибридологический

близнецовый

биохимический

статистический

популяционно-
статистический

генеалогический

цитогенетический

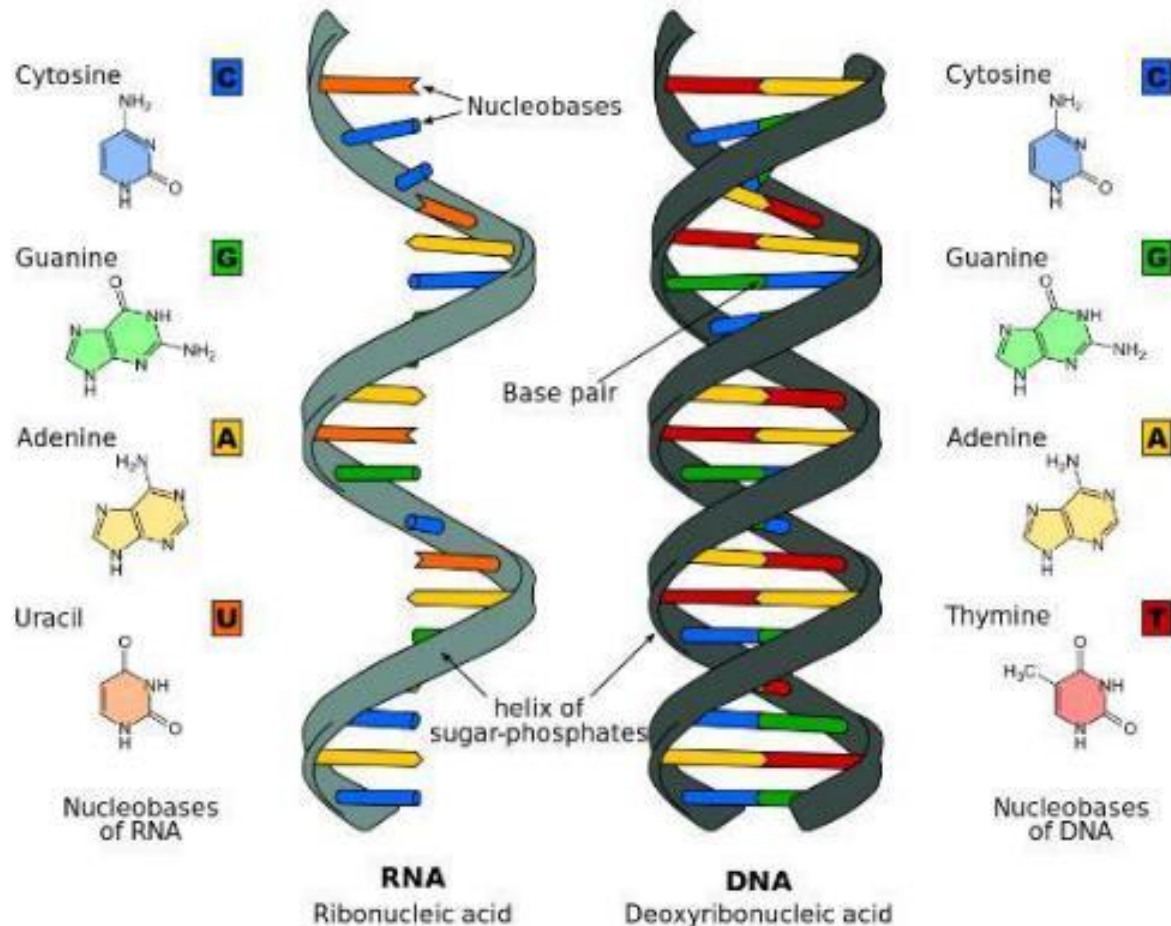
молекулярно-
генетический

гибридизации
соматических клеток

дерматоглифический

Молекулярно-генетические методы

- Молекулярно-генетические методы это самые современные методы исследования генетического материала клеток человека, который представлен дезоксирибунуклеиновой (ДНК) и рибунуклеиновой (РНК) кислотами.



- Молекулярно-генетические исследования наследственных патологий также используют с целью изучения человеческого генома. Блот-гибридизация по Саузерну позволяет в данном случае определить необходимые для этого особые фрагменты ДНК. При этом вначале прибегают к денатурации ДНК, в результате чего получают фрагменты в виде одной цепочки и их переносят на фильтр (нейлоновый или нитроцеллюлозный), который замочен в буферном растворе.
- Гель, на котором находятся ДНК-фрагменты, переносят на фильтровальную бумагу с солевым раствором (с высоким %концентрации). Сверху накладывается по очереди нитроцеллюлозный фильтр и фильтровальная, но сухая бумага (для впитывания солевого раствора). В итоге одноцепочечные ДНК остаются на фильтре в таком же положении как на геле.

- Еще одним геном предрасположенности к ревматоидному артриту считается ген IDDM9. Японские исследователи математически вывели, что наличие данного гена повышает риск развития ревматоидного артрита на 27%. Немаловажную роль в этиологии и патогенезе заболевания играет Т-клеточный иммунитет. В связи с этим ген TCRD (рецепторов Т-клеток) также является ответственным за возникновение ревматоидного артрита. Результаты целого ряда исследований показали, что мутация гена p53 приводят к возникновению его аномальных функций, что вызывает развитие костной деструкции. При ревматоидном артрите у многих пациентов отмечается аномальный биосинтез Fas-белка, вызванный мутацией Fas-гена. Исследования по выявлению в геноме человека генов «предрасположенности» к ревматоидному артриту продолжаются уже более четверти века. Полученные на сегодняшний день результаты являются весьма впечатляющими, однако работы будут продолжаться и дальше, что, возможно, позволит полностью понять этиологию и патогенез данного заболевания, а, следовательно, и разработать наиболее эффективные методы его лечения.

- Научно-исследовательская группа сравнила ДНК страдающих артритом пациентов с ДНК здоровых людей и обнаружила 42 области, которые, скорее всего, связаны именно с этим заболеванием. Есть надежда, что эта информация поможет разработать новейшие лекарства, компенсирующие подобные неисправности на генетическом уровне.

Ревматоидный артрит – одна из главных причин инвалидности по всему миру. По оценкам ВОЗ, это заболевание поражает одного человека из ста. Около половины взрослых людей с аутоиммунным заболеванием теряют способность работать полный рабочий день в течение 10 лет после установления диагноза.

- Ткани, которые являются антигенно-идентичными, называются гистосовместимыми, они не индуцируют иммунные реакции отторжения. Ткани, которые обладают существенными антигенными различиями, называются гистонесовместимыми. Они генерируют реакции отторжения. Антигены, определяющие гистосовместимость, закодированы в более чем 40 различных локусах. Локусы, индуцирующие наиболее сильные иммунные реакции, картированы в главном комплексе гистосовместимости (ГКГ). Эта система у человека получила название HLA-системы.

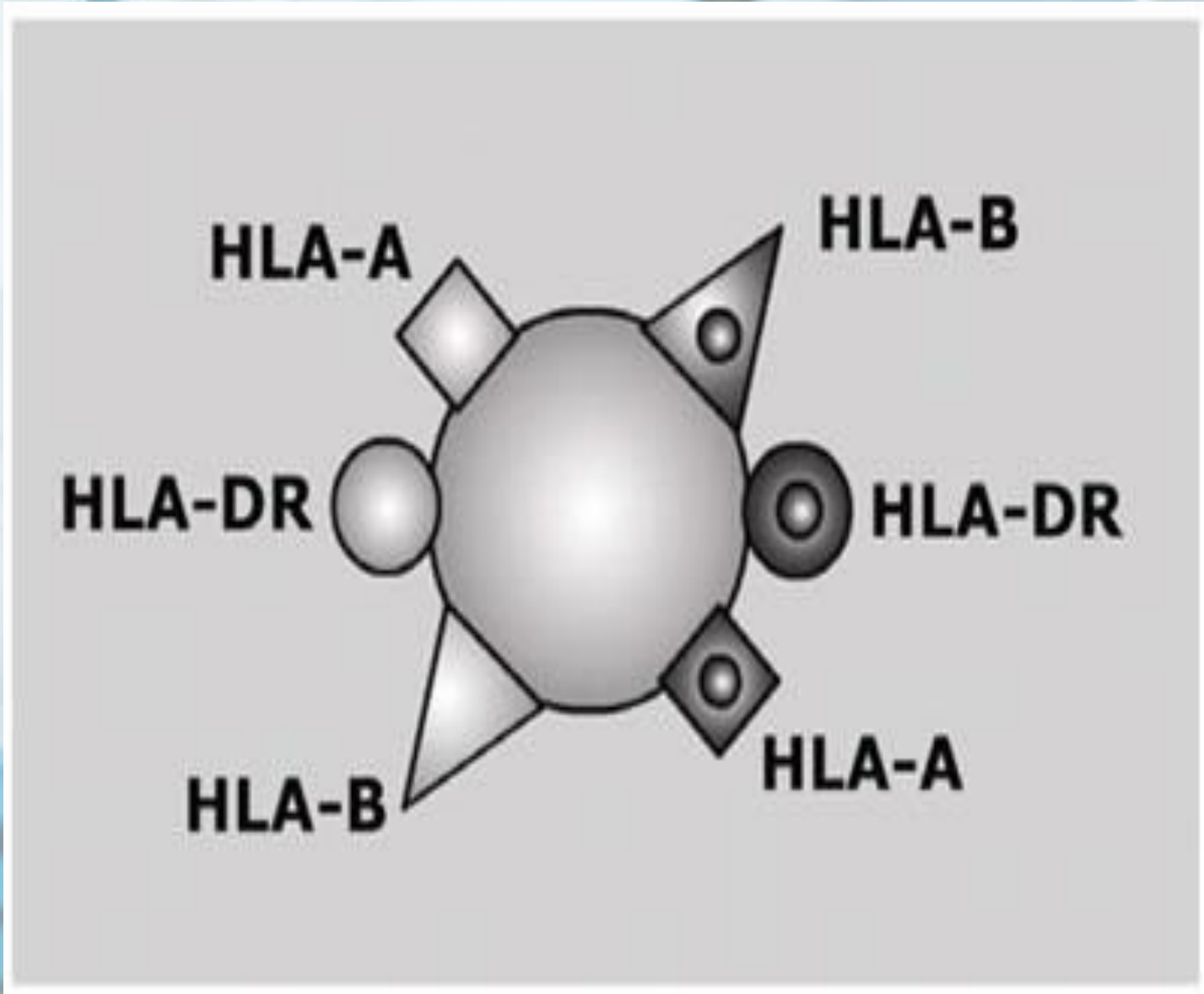
- **Иммуногенетика** — одно из важных направлений современной иммунологии, изучающее генетический контроль иммунного ответа. Основная генетическая структура, ответственная за этот контроль, — главный комплекс гистосовместимости — МНС (англ. Major Histocompatibility Complex).

HLA - СИСТЕМА

- Определение совместимости пациента и донора кроветворных клеток осуществляется с помощью системы HLA (это английская аббревиатура, которая расшифровывается как «human leucocyte antigens», а в дословном переводе - «человеческие лейкоцитарные антигены»).
- Система HLA является одной из наиболее изученных среди всех сложных генетических систем человека, поскольку именно она может помочь решить такие важные проблемы медицины, как трансплантация органов и тканей, борьба с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями.

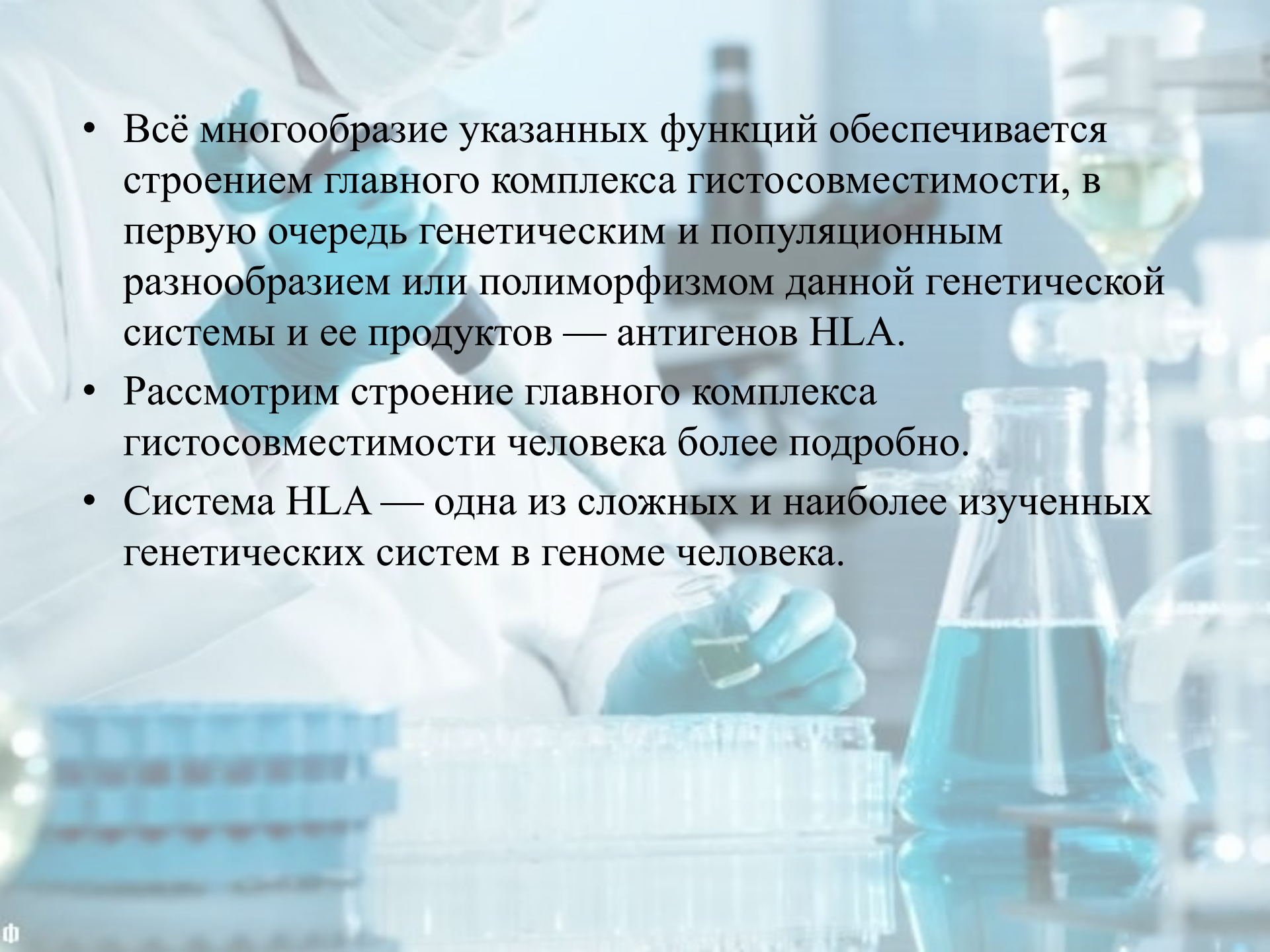
Строение

- HLA гены располагаются в 6-й хромосоме человека. Они подразделяются на области A, B, C, D и обозначаются как HLA-A, HLA-B HLA-C и HLA-D. В свою очередь каждая область имеет варианты (аллели). Область HLA-A имеет 23 аллеля, область HLA-B – 49 аллелей, область HLA-C – 8 аллелей. Область HLA-D является достаточно полиморфной и поэтому имеет подварианты: HLA-D, HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В свою очередь каждый подвариант тоже включает аллели: HLA-D – 19 аллелей, HLA-DR – 16 аллелей, HLA-DQ – 3 аллели и HLA-DP – 6 аллелей.



Система HLA обеспечивает регуляцию иммунного ответа, осуществляя важнейшие функции:

- презентацию антигена Т-лимфоцитам;
- селекцию и обучение Т- и В-лимфоцитов в отношении «своего» и «не своего»;
- взаимодействие клеток иммунной системы организма;
- распознавание «своего» и «не своего», в том числе измененных «своих» клеток;
- участие в реакциях «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина»;
- запуск, реализацию и генетический контроль иммунного ответа;
- формирование иммунной толерантности, в том числе в период беременности, к полуаллогенному плоду;
- обеспечение выживания человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии.

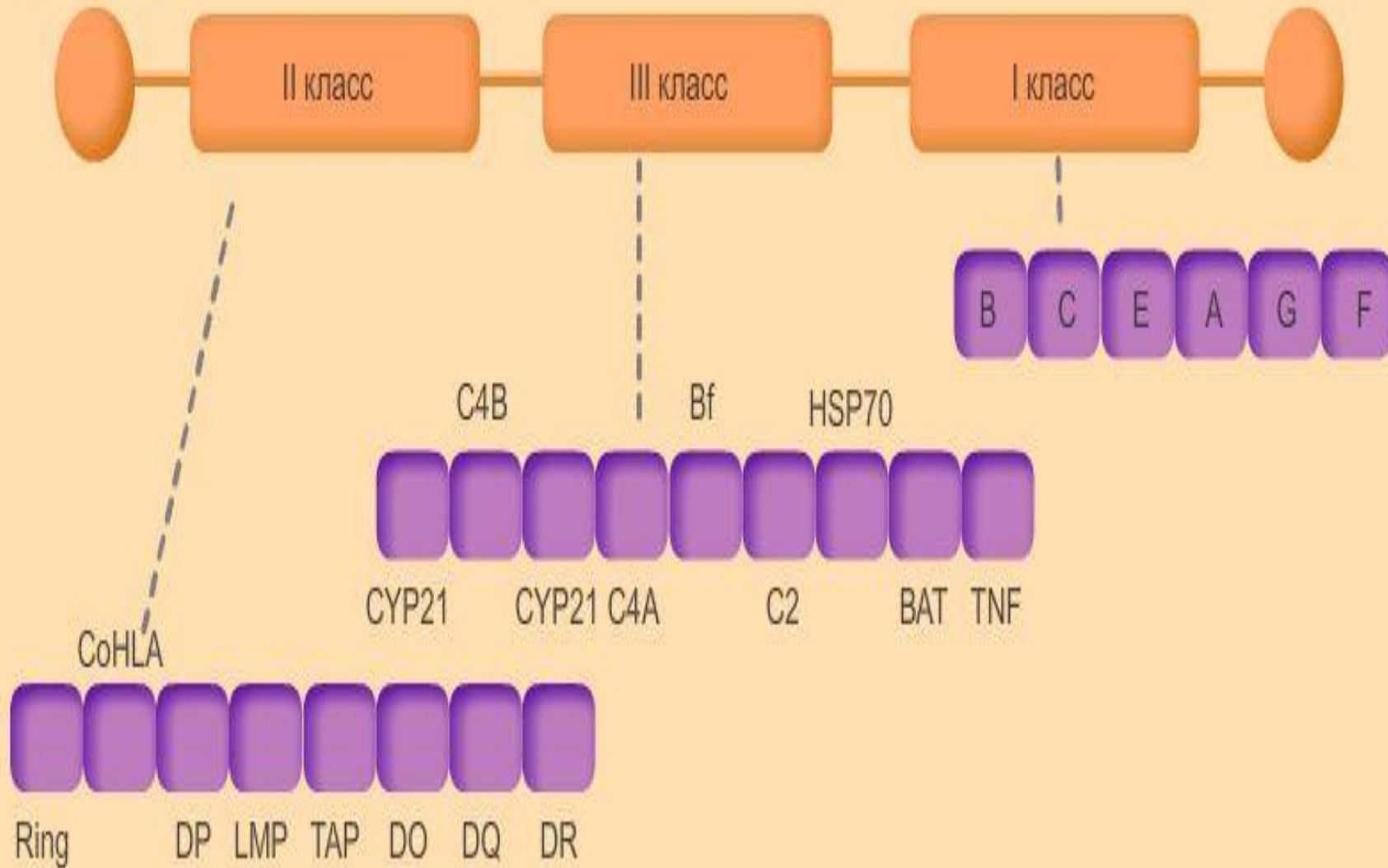
- 
- Всё многообразие указанных функций обеспечивается строением главного комплекса гистосовместимости, в первую очередь генетическим и популяционным разнообразием или полиморфизмом данной генетической системы и ее продуктов — антигенов HLA.
 - Рассмотрим строение главного комплекса гистосовместимости человека более подробно.
 - Система HLA — одна из сложных и наиболее изученных генетических систем в геноме человека.

Классы HLA - системы

- Среди областей генов HLA выделяют 3 класса.
- К 1 классу относятся гены HLA-A, HLA-B и HLA-C. Эти гены контролируют образование так называемых трансплантационных антигенов, т.е. антигенов пациента, которые распознают донорские клетки, введенные пациенту в трансплантате.
- Ко 2-му классу относятся гены HLA-D регулирующие силу иммунного ответа.
- Гены 3-го класса контролируют синтез молекул системы комплемента - неспецифического фактора иммунной защиты организма. Система HLA индивидуально неповторима. Полное соответствие по всем антигенам донора и реципиента наблюдается только у однояйцевых близнецов. Во всех других случаях развивается иммунологический конфликт - реакция отторжения трансплантата.

Центромера

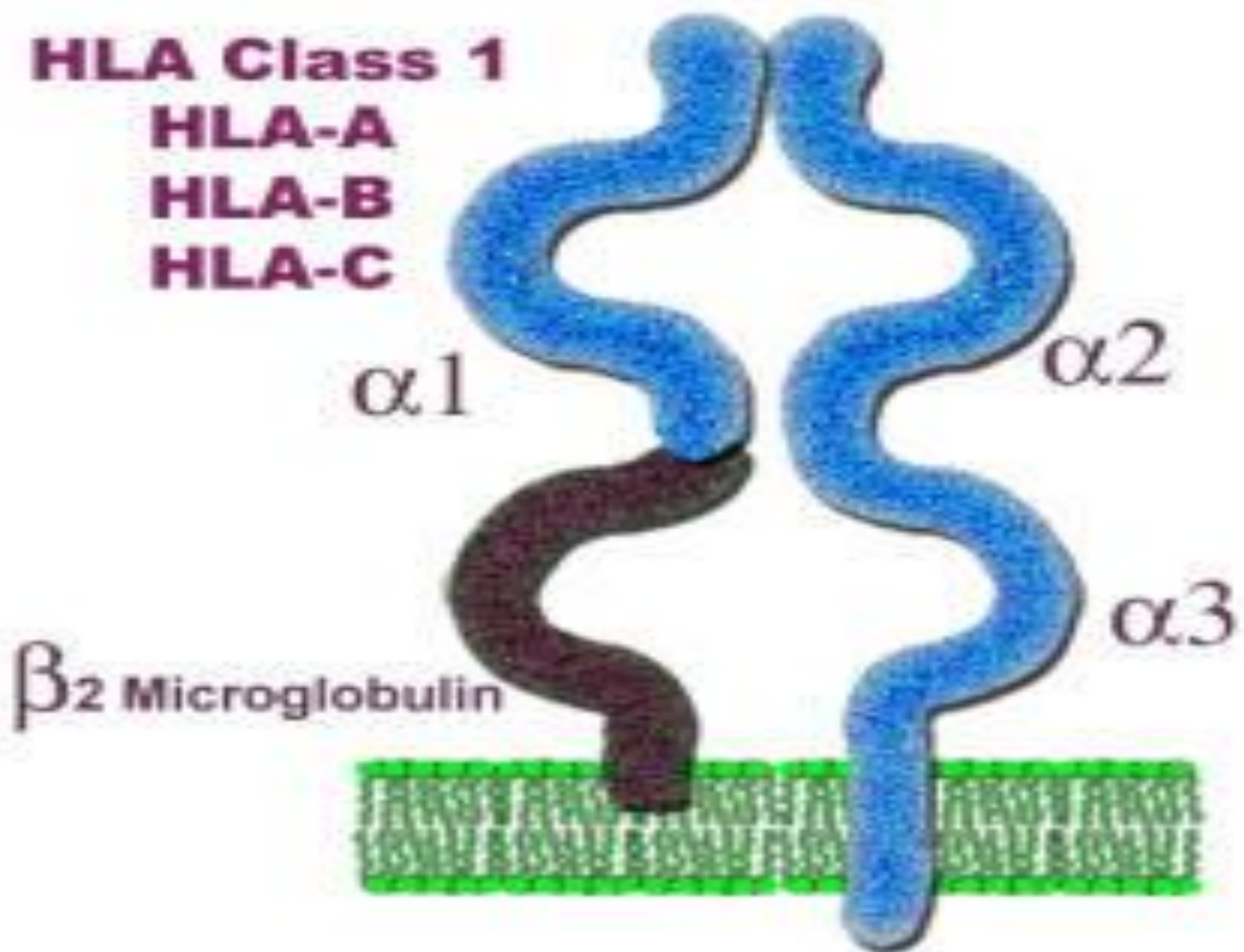
Теломера



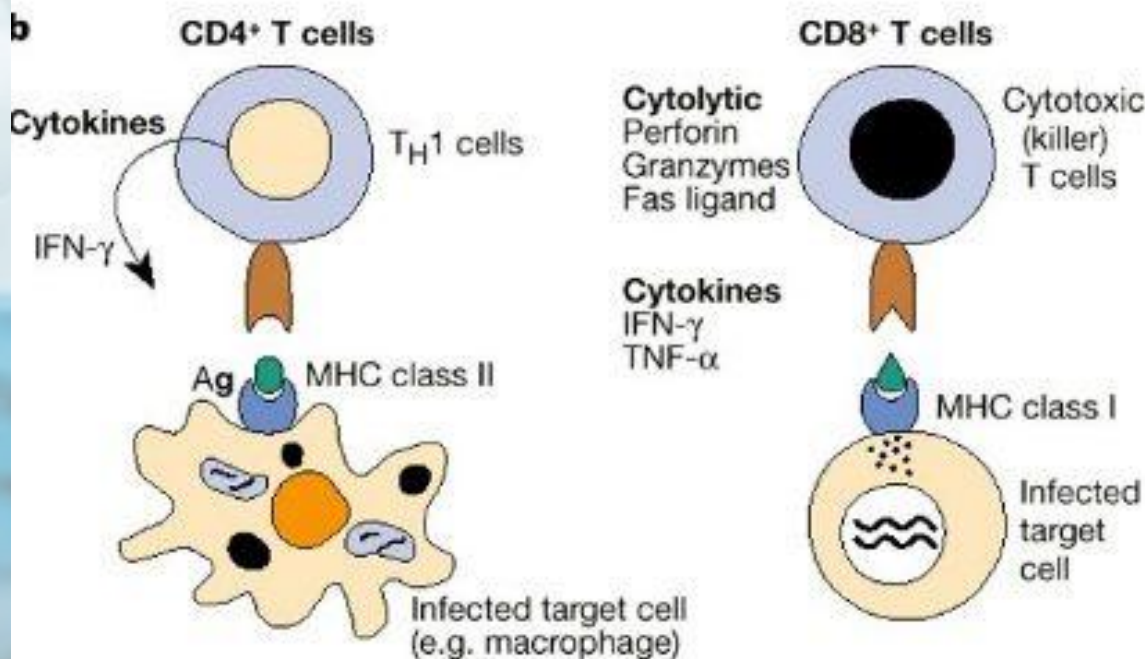
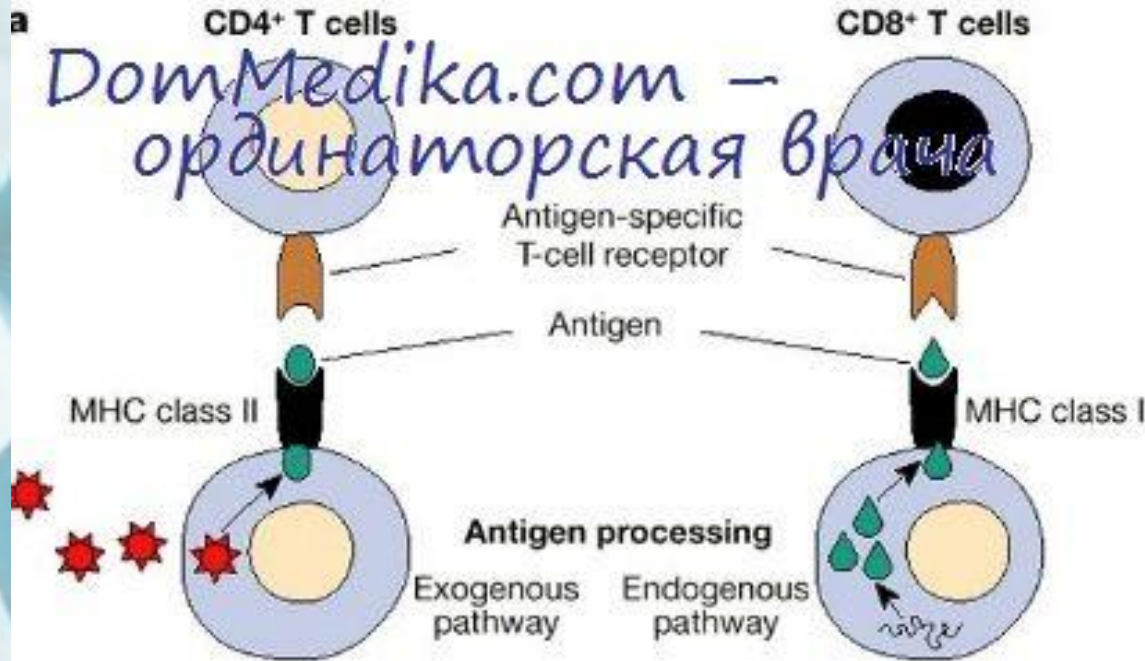
HLA включает три класса генов:

- гены класса I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) наиболее удалены от центromеры, отличаются очень высоким полиморфизмом и кодируют синтез молекул HLA класса I. В дополнение к классическим локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C к первому классу относят «неклассические» гены HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H (см. рис. 7-1). Они менее полиморфны. Молекулы генов HLA-E презентируют лидерные пептиды собственных классических молекул MHC-I и распознаются с помощью рецептора CD94/NKG2, ингибирующего активность NK-клеток. Клетки, лишенные молекул HLA-I (инфицированные вирусом, опухолевые), не экспрессируют HLA-E, и NK-клетки получают сигнал, подавляющий их активность. HLA-G экспрессируют только клетки трофобласта; он подавляет действие NK-клеток;

HLA Class 1
HLA-A
HLA-B
HLA-C



- гены класса II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) контролируют синтез молекул HLA класса II. К этой же группе генов относят LMP и TAP, кодирующие белки, которые ответственны за процессирование эндогенных антигенов;
- гены класса III кодируют молекулы врожденного иммунитета (компоненты комплемента C2, C4, ФНО, лимфотоксин, фактор В, вовлекаемый в альтернативный путь активации комплемента, белки теплового шока и др.).



Гены HLA-системы

- Гены HLA передаются потомству двумя блоками - по одному от каждого родителя. Такой блок носит название гаплотипа HLA. Ребенок наследует по два аллеля каждого гена HLA: один из материнского гаплотипа, другой - из отцовского. Если удастся определить лишь одну аллельную форму какого-либо антигена HLA, то это значит, что либо 2-ая аллель аналогична первой, либо в типизирующем наборе нет сыворотки для определения другой аллельной формы антигена.

Определение антигенов системы HLA осуществляется 2 способами:

- 1. серологическим методом с использованием специальных антисывороток к антигенам HLA;
- 2. молекулярно-генетическим методом определения данных антигенов (полимеразная цепная реакция - ПЦР). При серологической методике необходимая достоверность идентификации антигенов требует, чтобы определение каждого антигена проводилось «батареей» антисывороток. Серологическими методами определено более 100 антигенов HLA.

Результаты

- С помощью молекулярно-генетических методик ежегодно открываются новые аллели генов HLA. Для определения совместимости пациента и донора кроветворных клеток по системе HLA используется дорогостоящий молекулярно-генетический метод, как наиболее точный и надежный, позволяющий исключить какие-либо лабораторные ошибки и обеспечить наибольшую совместимость.

Результаты

- Результат определения HLA-типа обозначается следующим образом: HLA, затем указывается область исследуемого гена и его аллель. Например: HLA–A 01; 02. Это значит, что исследована область A и выявлены гены аллелей 01 и 02. Подбор донора для реципиента, нуждающегося в трансплантации кроветворных клеток осуществляется по совместимости генов областей A, B и D у донора и реципиента.

- В настоящее время установлена связь этого гена и с другими заболеваниями. Антиген HLA-B27 выявляется у большинства лиц, заболевших серонегативными спондилоартропатиями. Это разнородная группа заболеваний, в которую входят: анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева), псориатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, артрит при воспалительных заболеваниях кишечника, рецидивирующий увеит, ювенильный ревматоидный артрит. В клинической симптоматике всех этих заболеваний отмечается артрит периферических суставов и суставов осевого скелета, кроме того, при этих заболеваниях обычно не находят ревматоидный фактор и другие аутоантитела. Именно последний феномен позволяет назвать их «серонегативными». Совокупная встречаемость этих заболеваний в популяции составляет около 0,5%, что позволяет отнести их к часто встречающимся аутоиммунным заболеваниям.
- Роль молекулы HLA-B27 в патогенезе серонегативных спондилоартропатий окончательно не установлена. Среди гипотез обсуждается роль архитектоники этой молекулы - особенностей конформационной укладки тяжелых цепей молекул HLA-B27, возможная роль молекулярной «мимикрии» чужеродных антигенов, презентруемых HLA-B27 (ряда бактерий желудочно-кишечного или урогенитального тракта) и собственных антигенов. В частности, в качестве соответствующих инфекционных триггеров HLA-B27-зависимых реактивных артритов, подтверждается роль *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*.

HLA-типирование "Программа диагностика серонегативных спондилоартропатий – HLA-B27"

Антиген HLA-B27 играет важную роль в дифференциальной диагностике аутоиммунных болезней. Его выявляют у 90% больных анкилозирующим спондилитом и синдромом Рейтера. У здоровых людей антиген HLA-B27 встречается в 8% случаев. HLA-B27 часто обнаруживают при ювенильном ревматоидном артрите, псориатическом артрите, хронических воспалительных заболеваниях кишечника, протекающих с сакроилеитом, спондилитом, увеите и реактивном артрите, вызванном *Yersinia spp.*, *Chlamydia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*

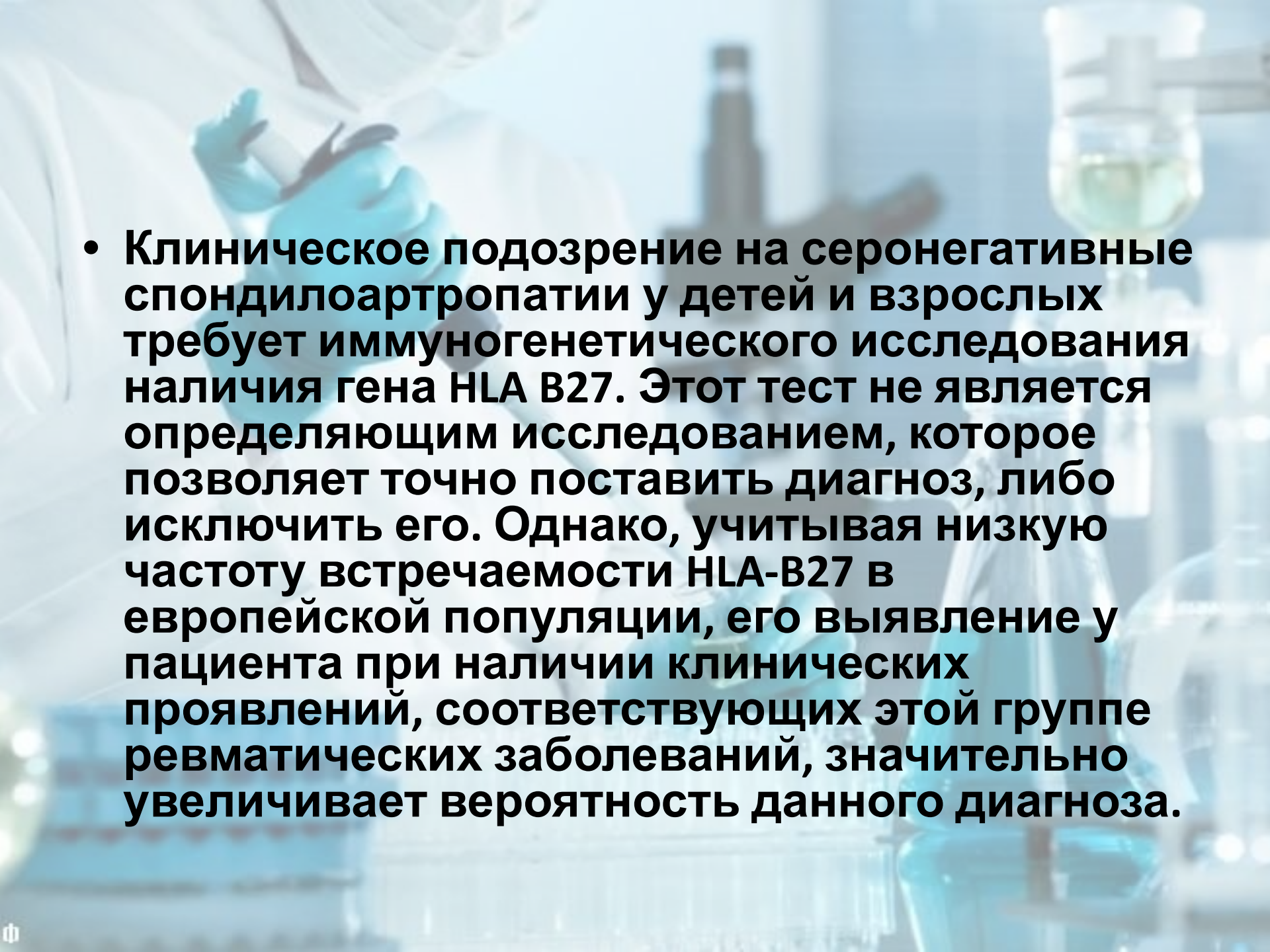
Определение антигена HLA-B27 проводят в следующих случаях:

- при необходимости исключить анкилозирующий спондилит у больного, родственники которого страдают этим заболеванием;
- для дифференциальной диагностики неполной формы синдрома Рейтера (без уретрита или увеита) с гонококковым артритом;
- для дифференциальной диагностики синдрома Рейтера, сопровождающегося тяжелым артритом, с ревматоидным артритом;
- при обследовании больных ювенильным ревматоидным артритом.

Если антиген HLA-B27 не обнаружен, анкилозирующий спондилит и синдром Рейтера маловероятны, хотя полностью исключить эти заболевания в таком случае нельзя.

Материал для исследования: венозная кровь

Срок исполнения: 5 дней.

- 
- **Клиническое подозрение на серонегативные спондилоартропатии у детей и взрослых требует иммуногенетического исследования наличия гена HLA B27. Этот тест не является определяющим исследованием, которое позволяет точно поставить диагноз, либо исключить его. Однако, учитывая низкую частоту встречаемости HLA-B27 в европейской популяции, его выявление у пациента при наличии клинических проявлений, соответствующих этой группе ревматических заболеваний, значительно увеличивает вероятность данного диагноза.**

Использованные литературы.

1).Ф.Н. ГИЛЬМИЯРОВА, Н.А. КОЛОТЬЕВА, О.А. ГУСЯКОВА, И.Ф. СИДОРОВА, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Ремедиум № 4 (154) май, 2017 г.

2).<http://niikelsoramn.ru/dlja-pacientov/molekul-genetic-issledov/> .



Спасибо за внимание!!!