

Генетика человека

изучает явления наследственности и изменчивости у человека на всех уровнях его организации: молекулярном, клеточном, организменном и популяционном.

-
- **Современная генетика человека базируется на законах классической менделевской генетики, которые имеют универсальный характер, то есть они в равной степени применимы для микроорганизмов, растений и животных, включая человека.**

Человек – объект генетического анализа

- Человек, как генетический объект, имеет целый ряд недостатков (неудобств).
- Известно, что основной для решения большинства генетических задач является гибридологический метод. «Удобный» с этой точки зрения объект должен обладать следующими свойствами: 1) легко скрещиваться в условиях эксперимента; 2) давать большое число потомков; 3) иметь короткий жизненный цикл; 4) обладать малым числом хромосом в геноме; 5) наследственные признаки не должны сильно модифицироваться у такого объекта под влиянием факторов среды.

Человек – объект генетического анализа

- **Понятно, что по всем этим пунктам человек не может быть отнесен к «удобным» объектом для генетического анализа, как, например, микроорганизмы или дрозофила. Однако, на практике, большинство из этих недостатков может быть в той или иной степени компенсировано.**

Человек – объект генетического анализа

- У человека нельзя по заранее составленной схеме получать и анализировать потомство, поскольку экспериментальные браки невозможны. Таким образом, при генетическом анализе у человека выпадает основа – экспериментальное скрещивание. Однако, эту трудность генетики преодолевают, используя разные подходы. Во-первых, генетик среди большого числа уже существующих семей всегда сможет подобрать именно те, которые соответствуют его теме исследования. Во-вторых, можно проводить анализ, гибридизуя отдельные клетки вне организма человека, то есть в клеточных культурах.

Человек – объект генетического анализа

- **Ограниченное число потомков и продолжительный жизненный цикл. Известно, что в большинстве современных семей в развитых странах рождается в среднем 1-3 ребенка, что явно не достаточно для анализа расщепления признаков в пределах одной семьи. (К примеру, самка дрозофилы за один раз откладывает сотни яиц). Кроме этого, смена одного поколения у человека происходит в среднем за 25-30 лет (у дрозофилы – 10-12 суток); таким образом, генетик при жизни может наблюдать всего 1-2 поколения.**
- **Эти недостатки так же могут быть частично устранимы за счет использования в исследованиях больших выборок (популяций), а так же за счет регистрации признаков в течение длительного времени.**

Человек – объект генетического анализа

- **В определенной мере затрудняет проведение генетического анализа человека относительно большое число хромосом в кариотипе – 23 пары (у дрозофилы – 4 пары, у гороха – 7 пар, у аскариды – 1 пара).**
- **Однако разработка и внедрение в практику методов дифференциального окрашивания хромосом, гибридизации соматических клеток, молекулярно-цитогенетических и др. технологий устраняют эту трудность.**

Человек – объект генетического анализа

- **Наконец, для человека характерен большой гено - и фенотипический полиморфизм. Проявление многих признаков в значительной степени зависит от условий внешней среды, при этом само понятие «среда» имеет для человека более широкое толкование, т.к. помимо абиотических и биотических факторов средой для человека являются и социальные факторы, трудно изменяемые по желанию исследователя.**

Методы генетики человека

Современная генетика человека оперирует большим набором методов исследования. Рассмотрим подробнее основные из этих методов:

- **Генеалогический метод**
- **Близнецовый метод**
- **Популяционный метод**
- **Цитогенетический метод**
- **Биохимические методы**
- **Молекулярно-генетические методы**

Генеалогический метод

- был предложен в 1883г. Ф. Гальтоном. Он основан на построении родословных и прослеживании в ряду поколений передачи определенного признака. Этот метод относится к наиболее универсальным методам генетики человека. Он широко применяется для решения теоретических и прикладных проблем.
- Метод позволяет установить: 1) является ли данный признак наследственным (по проявлению его у родственников); 2) тип и характер наследования (доминантный или рецессивный, аутосомный или гоносомный); 3) зиготность лиц родословной (гомо- или гетерозиготы); 4) пенетрантность гена (частота его проявления); 5) вероятность рождения ребенка с наследственной патологией (генетический риск).

Генеалогический метод

- **Этапы генеалогического анализа складываются из: 1) сбора данных обо всех кровных родственниках обследуемого (пробанда) с максимально широким охватом сведений по восходящей и нисходящей линии, а также по боковым направлениям; 2) графического построения родословной, сопровождаемого поясняющими описаниями (легенда); 3) анализа родословной и формулированием ВЫВОДОВ.**

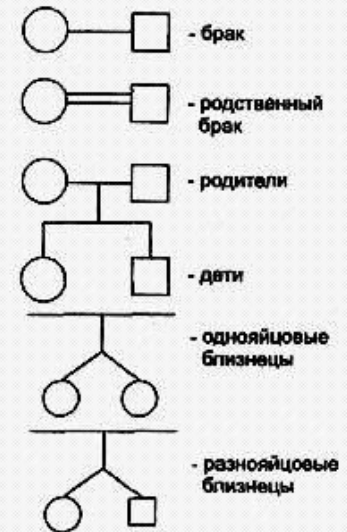
Генеалогический метод

- Обычно родословная собирается по одному или нескольким признакам. В зависимости от цели исследования родословная может быть полной или ограниченной. Сложность сбора анамнеза заключается в том, что пробанд должен хорошо знать родственников по линии матери и отца не менее трех поколений и состояние их здоровья, что бывает крайне редко. Одного опроса, как правило, недостаточно. Для некоторых членов родословной приходится назначать полное клиническое, параклиническое или лабораторное обследование для уточнения состояния их здоровья.

Генеалогический метод

При построении родословной необходимо соблюдать следующие правила:

- 1) родословную начинают строить с пробанда;
- 2) каждое поколение нумеруется римскими цифрами слева;
- 3) символы, обозначающие особей одного поколения, располагаются на горизонтальной линии и нумеруются арабскими цифрами. Основой родословной является **пробанд** - лицо, с которого начинается исследование семьи. В родословных пробанд помечается стрелкой.



Условные обозначения для графического построения родословной

Генеалогический метод

- Первая задача при анализе родословной - **установление наследственного характера признака**. Если в родословной встречается один и тот же признак (болезнь) несколько раз, то можно думать о его наследственной природе.
- После обнаружения наследственного характера признака (болезни) необходимо **установить тип наследования**. Для этого используются принципы генетического анализа и различные статистические методы обработки данных многих родословных.

Близнецовый метод

введен в медицинскую практику Ф. Гальтоном в 1875г.

- основан на явлении многоплодной беременности у человека и позволяет определить соотносительную роль генотипа и среды в проявлении признаков.
- Различают **МОНОЗИГОТНЫХ** (вверху) и **ДИЗИГОТНЫХ** (внизу) близнецов.



Близнецовый метод

- **Монозиготные (однойцовые) близнецы развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки. Монозиготные близнецы имеют совершенно одинаковый ядерный генотип, но могут отличаться по фенотипу, что обусловлено воздействием факторов внешней среды.**
- **Дизиготные (двуяйцовые, двойни) близнецы развиваются после оплодотворения сперматозоидами нескольких одновременно созревших яйцеклеток (полиовуляция). Такие близнецы имеют разный генотип, и их фенотипические отличия обусловлены как генотипом, так и факторами внешней среды. Частота появления близнецов у людей составляет около 1% (1/3 однойцевых, 2/3 разнояйцевых).**

Близнецовый метод

- **Монозиготные близнецы имеют большую степень сходства по признакам, которые определяются в основном генотипом. Например, они всегда однополы, у них одинаковые группы крови по разным системам (ABO, Rh, MN и др.), одинаковый цвет глаз, однотипные дерматоглифические узоры на пальцах и ладонях и др. Эти фенотипические признаки используются в качестве критериев диагностики зиготности близнецов.**

Близнецовый метод

- Процент сходства близнецов по изучаемому признаку называется **конкордантностью**, а процент различия - **дискордантностью**. При сопоставлении монозиготных и дизиготных близнецов определяют коэффициент парной конкордантности, указывающий на долю близнецовых пар, в которых изучаемый признак проявился у обоих партнеров. Этот коэффициент выражается в процентах или в долях единицы и определяется по формуле: $K = C / C + D$, где C – число конкордантных пар, D – число дискордантных пар.

Близнецовый метод

Признаки	Конкордантность, %	
	МБ	ДБ
Группа крови (AB0)	100,0	46,0
Цвет волос	97,0	23,0
Цвет глаз	99,5	28,0
Папиллярные узоры	92,0	40,0
Шизофрения	67,0	12,1
Сахарный диабет	84,0	37,0
Косолапость	45,5	18,2
Туберкулез	66,7	23,0
Корь	97,4	95,7
Бронхиальная астма	19,0	4,8

Так как монозиготные близнецы имеют одинаковый генотип, то конкордантность у них выше, чем у дизиготных.

Близнецовый метод

- Для количественной оценки роли наследственности и среды в развитии того или иного признака обычно используется коэффициент наследуемости, вычисляемый по формуле Хольцингера:

$$H = \frac{KMБ(\%) - KДБ(\%)}{100\% - KДБ(\%)}$$

- где H – коэффициент наследуемости, КМБ - конкордантность монозиготных близнецов, КДБ - конкордантность дизиготных близнецов. Если результат расчетов по формуле Хольцингера приближается к единице, то основная роль в развитии признака принадлежит наследственности, и наоборот, чем ближе результат к нулю, тем больше роль средовых факторов.

Популяционный метод

Методы генетики популяций широко применяют в исследованиях человека для решения следующих задач:

- **изучения частоты генов, аллелей и генотипов в популяции (в т.ч. – генов, вызывающих наследственные болезни);**
- **анализа закономерности мутационного процесса в популяциях;**
- **сопоставления роли генотипа и средовых факторов в формировании фенотипического полиморфизма человека по многим признакам, а также в возникновении болезней с наследственной предрасположенностью.**

Популяционный метод

- В основе метода лежит закон Харди — Вайнберга. Этот закон оказывается вполне пригодным для анализа генетических процессов в крупных популяциях (большими считаются популяции, насчитывающие свыше 4,5 тыс. людей) где идет относительно свободное скрещивание.
- Статистический анализ распространения отдельных наследственных признаков (генов) в популяциях людей в разных странах позволяет определить адаптивную ценность конкретных генотипов.

Цитогенетический метод

- - используют для изучения нормального кариотипа человека, а также при диагностике наследственных заболеваний, связанных с геномными и хромосомными мутациями. Кроме того, этот метод применяют при исследовании мутагенного действия различных химических веществ, пестицидов, инсектицидов, лекарственных препаратов и др.

Этапы цитогенетического метода

- культивирование клеток человека (чаще лимфоцитов) на искусственных питательных средах;
- стимуляция митозов фитогемагглютинином (ФГА);
- добавление алкалоида колхицина (разрушает нити веретена деления) для остановки митоза на стадии метафазы;
- обработка клеток гипотоническим раствором, вследствие чего хромосомы "рассыпаются" и лежат свободно;
- простое и дифференциальное окрашивание хромосом;
- изучение хромосом под микроскопом и фотографирование;
- вырезание отдельных хромосом и построение идиограмм.

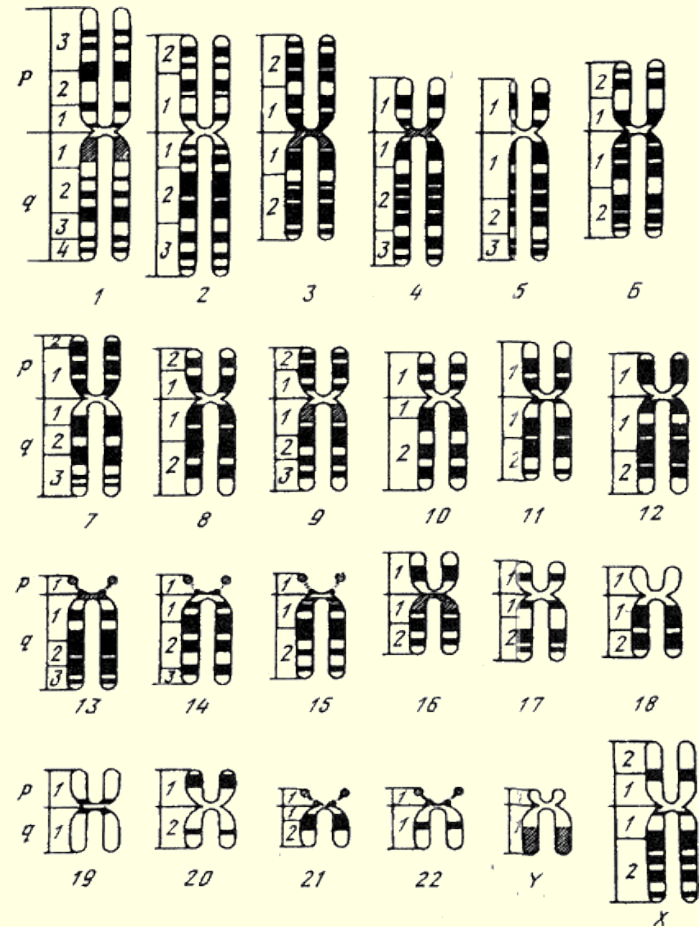


Методы дифференциального окрашивания хромосом человека

- **В 70-е годы XX века были разработаны методы дифференциального окрашивания хромосом человека, которые показали, что каждая пара хромосом имеет свой специфический характер чередования неокрашенных, светло- и темноокрашенных дисков (Парижская классификация хромосом человека). Разработка специальных методов окраски значительно упростила распознавание всех хромосом человека, а в совокупности с генеалогическим методом и методами клеточной и генной инженерии дала возможность соотносить гены с конкретными участками хромосом. Комплексное применение этих методов лежит в основе составления карт хромосом человека.**

Методы дифференциального окрашивания хромосом человека

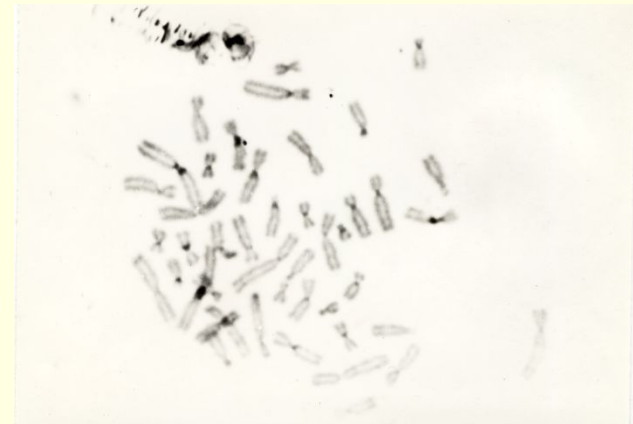
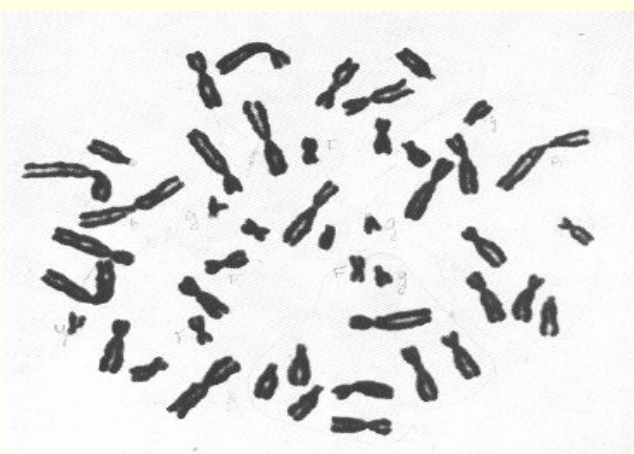
- Схематическое изображение дифференциально окрашенных хромосом человека согласно международной классификации



Генетическая карта X-хромосомы



Методы дифференциального окрашивания хромосом человека



Молекулярно-цитогенетические методы

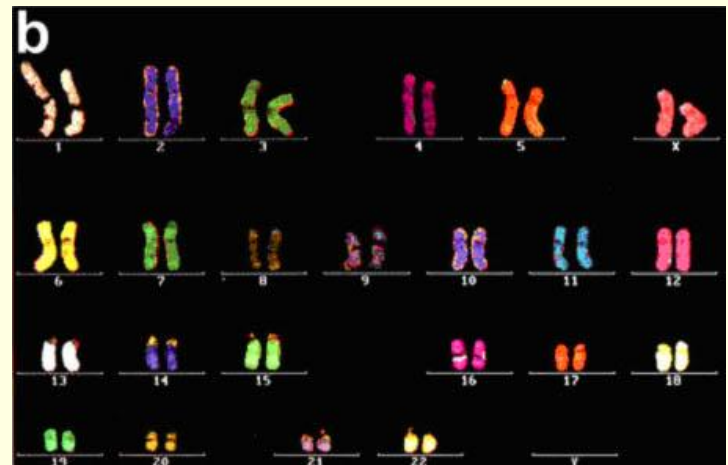
- основаны на технологии **флюоресцентной гибридизации in situ (FISH)**. Для исследуемой хромосомы или ее участка готовят однонитевой участок ДНК, к которому присоединяют биотин и дигоксигенин. Такой "помеченный" участок ДНК называется зондом. На микроскопическом препарате *in situ* денатурируют хромосомную ДНК щелочной обработкой, то есть разрывают связи между двумя цепочками ДНК. Препарат обрабатывают зондом. Так как последовательность нуклеотидов зонда и соответствующего участка исследуемой хромосомы комплементарны, то зонд присоединяется к хромосоме. В этом участке происходит ренатурация ДНК.

Молекулярно-цитогенетические методы

- Далее препарат обрабатывают стрептовидином (вещество, избирательно присоединяющееся к биотину) и антидигоксигениновым антителом (избирательно присоединяется к дигоксигенину). К этим веществам присоединяют флюоресцентные красители (родамин - красный цвет или флюоресцеин - зеленый цвет). В специальном люминесцентном микроскопе хорошо видны окрашенные хромосомы на фоне неокрашенных. С помощью метода FISH можно определять локализацию генов в хромосомах и все хромосомные aberrации.

Молекулярно-цитогенетические МЕТОДЫ

- **24-цветная FISH**
хромосом человека: **a** -
метафазная пластинка;
b - раскладка
хромосом.



(из Рубцов Н. Б., Карамышева Т. В. Вестн.
ВОГиС, 2000).

Биохимические методы

- **Наследственные заболевания, которые обусловлены генными мутациями, изменяющими структуру или скорость синтеза белков, обычно сопровождаются нарушением углеводного, белкового, липидного и других типов обмена веществ. Наследственные дефекты обмена можно диагностировать посредством определения структуры измененного белка или его количества, выявления дефектных ферментов или обнаружения промежуточных продуктов обмена веществ во внеклеточных жидкостях организма (крови, моче, поте и т.д.)**

Биохимические методы

- Кроме выявления гомозиготных носителей мутантных генов существуют методы выявления гетерозиготных носителей некоторых рецессивных генов, что особенно важно при медико-генетическом консультировании.
- Так, у фенотипически нормальных гетерозигот по фенилкетонурии после приема фенилаланина обнаруживается повышенное его содержание в крови.
- При гемофилии гетерозиготное носительство мутантного гена может быть установлено с помощью определения активности фермента, измененного в результате мутации.

Молекулярно-генетические методы

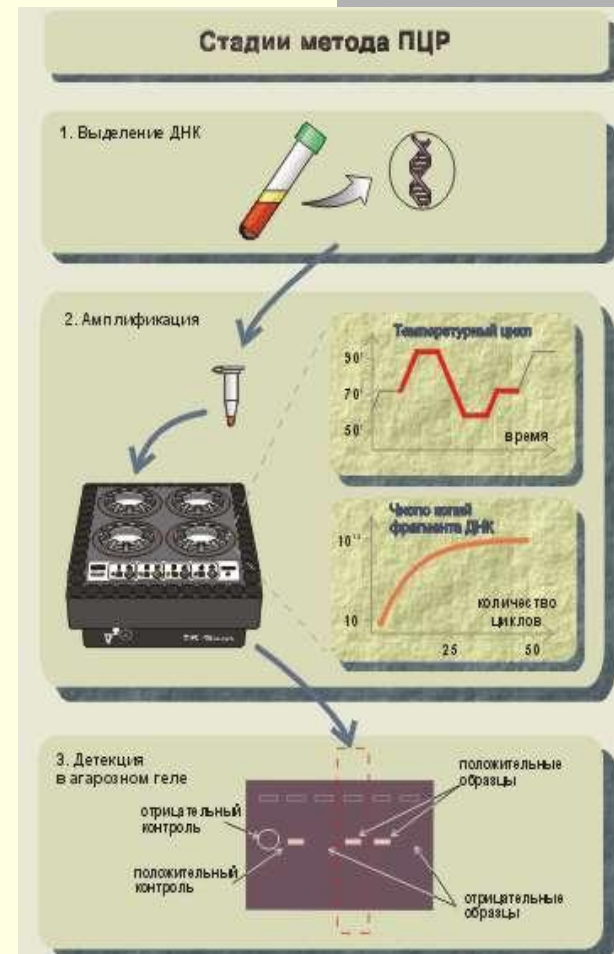
- - позволяют анализировать фрагменты ДНК, находить и изолировать отдельные гены и их сегменты и устанавливать в них последовательность нуклеотидов.

Молекулярно-генетические методы

- **Метод клонирования ДНК** позволяет изолировать отдельные гены или их части, создавать неограниченное количество их копий, транскрибировать и транслировать изолированные гены, что стало возможным благодаря открытию ферментов - рестриктаз. Эти ферменты "узнают" специфическую олигонуклеотидную последовательность в двухнитевой ДНК и разрезают ее в данном месте - сайте. Разные рестриктазы распознают различные последовательности нуклеотидов и разрезают ДНК в разных сайтах.

Молекулярно-генетические МЕТОДЫ

- Для получения достаточного количества фрагментов ДНК используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод селективной амплификации отдельных регионов ДНК посредством имитации *in vitro* репликации ДНК.
- Для проведения ПЦР необходимо наличия праймеров (прямых - «Forward» и обратных - «Reverse»), Taq-полимеразы, смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), буфер и определяемый образец.



Метод ПЦР

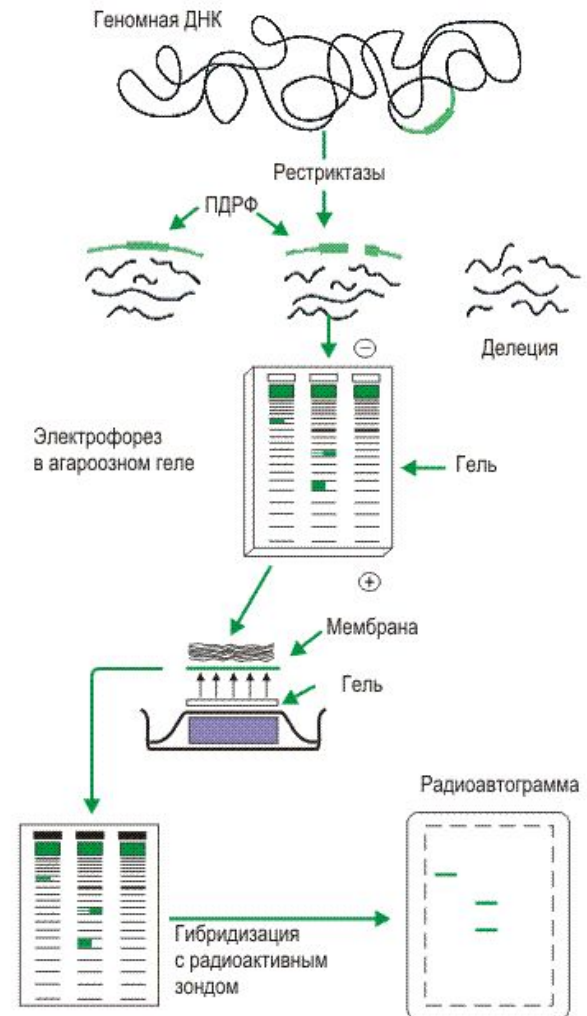
- Методом ПЦР можно синтезировать фрагмент ДНК *in vitro* и получить его как химически чистое вещество. Для синтеза используются короткие синтетические отрезки ДНК, называемые праймерами (затравка для синтеза). С 3'-конца праймера начинается синтез фрагмента ДНК по матричной нити, на которую он отжигается (прилипает при комплементарном взаимодействии между нуклеотидами праймера и матрицы). За один цикл достройки ДНК из двух нитей ДНК получают 4. В следующем цикле из 4 нитей получится уже 8 и т.д. Каждый цикл занимает несколько минут. За 30 циклов ПЦР нужный фрагмент размножится в 1 миллиард раз, что позволяет наблюдать фрагмент (после окраски).

Молекулярно-генетические методы

- Для выявления специфических фрагментов ДНК используется метод блот-гибридизации по Саузерну. Эта методика состоит из следующих этапов:
- после окончания электрофореза гели помещают в щелочной раствор для денатурации фрагментов ДНК - получают одноцепочечные ДНК;
- одноцепочечные ДНК вымывают из геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтры перпендикулярным поверхности геля током буфера; одноцепочечные фрагменты ДНК фиксируют на фильтре;

Блот-гибридизация по Саузерну

- для визуального выявления нужных фрагментов проводят гибридизацию исследуемого образца со специфическим по нуклеотидной последовательности меченым радиоактивно или флюоресцентной меткой олигонуклеотидным синтетическим зондом;
- радиоактивно меченные участки выявляют путем экспонирования фильтра с рентгеновской пленкой (ауторадиография);
- флюоресцентные метки выявляют в люминесцентном микроскопе.
- Этот метод позволяет обнаружить единственный ген среди десятков тысяч.



(из obi.img.ras.ru/humbio/har)