

Введение в генетику

асс. каф. Александрова Н.А.

Генетика человека изучает явления наследственности и изменчивости на всех уровнях его организации и существования: молекулярном, клеточном, организменном, популяционном, биохимическом, биогеохимическом.

Медицинская генетика изучает роль наследственности в патологии человека, закономерности передачи от поколения к поколению наследственных болезней, разрабатывает методы диагностики, лечения и профилактики наследственной патологии, включая болезни с наследственной предрасположенностью.

Объектом исследования клинической генетики является больной человек, его больные и здоровые родственники. Клиническая генетика изучает генетические механизмы наследственных заболеваний, роль генетических факторов в развитии ненаследственных форм патологии, а также разрабатывает способы их диагностики, профилактики и лечения. Основные вопросы, которые в настоящее время решает клиническая генетика, это изучение генетики заболевания в целом, формирование патологических признаков в результате взаимодействия генов, механизмов реализации генотипа в фенотип (клинические проявления).

Активно развивается фармакогенетика, на основе которой разрабатываются новые методы терапии для профилактики и лечения тех заболеваний, которые ранее трудно поддавались лечению или считались неизлечимыми.

Бурными темпами развивается генотерапия, то есть лечение путем введения фрагментов ДНК с определенной последовательностью в клетки пациента. Этот метод имеет реальные перспективы найти свое место в лечении многих моногенных наследственных заболеваний, позволяя исправлять генный дефект на ранних стадиях патологического процесса.

Активно развивается так называемая "соматическая генотерапия", когда гены вводятся в дефектные клетки, приводящие к развитию заболевания. Сейчас более 80% утвержденных для клинических испытаний генотерапевтических проектов связано с лечением онкологических заболеваний и наследственных иммунодефицитных состояний.

С генетической точки зрения все болезни в зависимости от относительной значимости наследственных и средовых факторов в их развитии можно подразделить на 3 группы: наследственные болезни, болезни с наследственной предрасположенностью, ненаследственные болезни.

Наследственными болезнями называют такие болезни, этиологическим фактором которых являются мутации. Проявление патологического действия мутации как этиологического фактора практически не зависит от среды. Последняя может только менять выраженность симптомов болезни и тяжесть её течения.

К заболеваниям этой группы относятся хромосомные и генные наследственные болезни с полным проявлением (болезнь Дауна, неUROфиброматоз, гемофилия, фенилкетонурия, муковисцидоз, ахондроплазия и т.д.). Болезнь может проявляться не обязательно в детском, но и в любом возрасте в соответствии с временными закономерностями генной экспрессии (например, средний возраст начала хореи Гентингтона равен 38—40 годам).

О болезнях с наследственной предрасположенностью говорят тогда, когда болезнь развивается у лиц с определённой генетической характеристикой под влиянием факторов окружающей среды. Эти болезни называют также мультифакториальными. Наследственность — этиологический и патогенетический фактор. Для пенетрантности мутантных генов необходим соответствующий фактор окружающей среды. К таким заболеваниям относятся, например, некоторые формы подагры, диабета, фармако- и экогенетические болезни. Подобные заболевания развиваются после контактов с проявляющим болезнь внешним фактором, специфическим для каждого мутантного гена. Этиологическими факторами могут являться средовые влияния, но частота возникновения и тяжесть течения болезней существенно зависят от наследственной предрасположенности (как в индивидуальном, так и в групповом варианте). К таким болезням относятся атеросклероз, гипертоническая болезнь, туберкулёз, экзема, псориаз, язвенная болезнь и др. Они возникают под действием внешних факторов (иногда не одного, а сочетания многих) гораздо чаще у лиц с наследственной предрасположенностью.

В происхождении *ненаследственных болезней* определяющую роль играет среда. Сюда относится большинство травм, инфекционных болезней, ожоги и т.д. Генетические факторы могут влиять только на течение патологических процессов (выздоровление, восстановительные процессы, компенсация нарушенных функций).

Термин "мутация" (от лат. *mutatio* — изменение) предложил в конце прошлого века голландский ботаник и эволюционист де Фриз, обозначив им внезапно возникающие новые формы растений. Как известно, мутации могут быть спонтанными, возникающими, без какой-либо видимой внешней причины, а также индуцированными, возникающими под действием различных внешних агентов: физических, химических и т.д.

Каждый генетический локус или определенное место локализации гена в хромосоме характеризуется определенным уровнем изменчивости, т. е. присутствием различных аллелей. Аллели разделяются на две группы - нормальные и мутантные, приводящие к нарушению работы гена. В любых популяциях и для любых генов нормальные аллели являются преобладающими.

Мутации этиологически обуславливают возникновение наследственных болезней. Факторы среды будут влиять в этом случае только на клиническую картину.

Этиологическими факторами наследственных болезней являются геномные, хромосомные и генные мутации.

Заболевания, связанные с геномными (изменение числа хромосом) и хромосомными (изменения структуры хромосом) мутациями, называются хромосомными болезнями.

Как правило, при хромосомных болезнях нарушаются сбалансированность набора генов и строгая детерминированность нормального развития организма. Это приводит к внутриутробной гибели эмбрионов и плодов, появлению врождённых пороков развития и других элементов клинической картины хромосомных болезней

Большинство форм наследственных заболеваний обусловлено генными мутациями, т.е. молекулярными изменениями на уровне ДНК (муковисцидоз, гемофилия, фенилкетонурия, нейрофиброматоз, миопатия Дюшенна и т.д.). Это генные болезни.

Генные мутации могут выражаться не только в специфических проявлениях, но и в неспецифическом снижении сопротивляемости организма сопутствующим заболеваниям, обуславливая хронизацию последних. Наследственная конституция может существенно изменять широко известные наследственно обусловленные патологические реакции на различные лекарственные вещества; во-вторых, это полиморфизм по скорости выведения или окисления некоторых лекарственных веществ либо метаболитов, модифицирующих фармакокинетику ряда других лекарственных препаратов.

В основу генетической классификации наследственных болезней положен этиологический принцип, а именно тип мутаций и характер взаимодействия со средой.

Всю наследственную патологию можно разделить на 5 групп: генные болезни, хромосомные болезни, болезни с наследственной предрасположенностью (синонимы: мультифакториальные, многофакторные), генетические болезни соматических клеток и болезни генетической несовместимости матери и плода.

Каждая из этих групп в свою очередь подразделяется в соответствии с более детальной генетической характеристикой и типом наследования. Как известно, в зависимости от уровня организации наследственных структур различают генные, хромосомные и геномные мутации, а в зависимости от типа клеток — гаметические и соматические. Наследственные болезни в строгом смысле слова подразделяют на две большие группы: генные и хромосомные.

Деление наследственных болезней на эти две группы не формальное. Генные мутации передаются из поколения в поколение в соответствии с законами Менделя, в то время как большинство хромосомных болезней, обусловленных анеуплоидиями, вообще не наследуется (летальный эффект с генетической точки зрения), а структурные перестройки (инверсии, транслокации) передаются с дополнительными рекомбинациями, возникающими в мейозе носителя перестройки.

Генетические болезни соматических клеток выделены в отдельную группу наследственной патологии недавно. Поводом к этому послужило обнаружение при злокачественных новообразованиях специфических хромосомных перестроек в клетках, вызывающих активацию онкогенов (ретинобластома, опухоль Вильмса).

Наряду с болезнями, этиологически строго детерминированными наследственностью (генные и хромосомные) или факторами среды (травмы, ожоги), есть большая и нозологически разнообразная группа болезней, развитие которых определяется взаимодействием определённых наследственных факторов (мутаций или сочетаний аллелей) и факторов среды. Эту группу болезней называют болезнями с наследственной предрасположенностью.

Болезни с наследственной предрасположенностью могут быть моногенными и полигенными. Для их реализации недостаточно только соответствующей генетической конституции индивида — нужен ещё фактор или комплекс факторов среды, «запускающих» формирование мутантного фенотипа (или болезни). С помощью средового фактора реализуется наследственная предрасположенность.

Итак, наследственная предрасположенность к болезни может иметь полигенную или моногенную основу.

Моногенная наследственная предрасположенность определяется одним геном, т.е. связана с патологической мутацией данного гена, но для патологического проявления мутации требуется обязательное действие внешнесредового фактора (как правило, не одного, а нескольких), который обычно точно идентифицируется и по отношению к данной болезни может рассматриваться как специфический.

Иначе говоря, при моногенных болезнях генетический дефект связан с мутацией в единичном локусе хромосомы.

Полигенные болезни обусловлены совокупным действием нескольких условно измененных генов. В этих случаях генетический дефект вызывает предрасположение, и болезнь является следствием сложного взаимодействия генетических и средовых детерминант.

Моногенные болезни - заболевания, в основе которых лежат генные мутации, состоящие в изменении порядка нуклеотидных последовательностей в молекуле ДНК, влияющих на последовательность аминокислот в белке, кодируемым данным геном. Основным признаком, указывающим на моногенный характер патологии, является менделирующий характер наследования. Моногенные болезни делятся по типу наследования на аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, х - сцепленные доминантные, х - сцепленные рецессивные, у - сцепленные.

Для всех перечисленных типов заболеваний характерны генетическая гетерогенность и клинический полиморфизм.

Генетическая гетерогенность проявляется в том, что в развитии сходных фенотипов (т.е. общности в клинических проявлениях) могут лежать мутации разных генов или разных участков одного и того же гена. Поэтому при одном и том же заболевании их типы генетической детерминации могут быть различными (например: описано 9 различных типов мукополисахаридозов).

Клинический полиморфизм заключается в наблюдаемых различиях клинических картин при одной и той же форме мутации.

Полигенная наследственная предрасположенность определяется сочетанием аллелей нескольких генов. Каждый аллель в отдельности скорее нормальный, чем патологический. Предрасполагает к болезням определённая их комбинация. Свой патологический потенциал они проявляют вместе с комплексом нескольких внешнесредовых факторов. Это мультифакториальные болезни. Соотносительная роль генетических и средовых факторов различна не только для данной болезни, но и для каждого больного.

Болезни с наследственной предрасположенностью с определённой долей условности можно подразделить на следующие основные группы: 1) врождённые пороки развития; 2) распространённые психические и нервные болезни; 3) распространённые болезни среднего возраста.

Болезни с наследственной предрасположенностью отличаются от других форм наследственной патологии (генных и хромосомных болезней) характером клинической картины. В отличие от генных болезней, при которых всех членов семьи пробанда можно разделить на больных и здоровых, клиническая картина болезней с наследственной предрасположенностью имеет непрерывные клинические переходы (клинический континуум) в пределах одной и той же нозологической формы. Для болезней с наследственной предрасположенностью характерно различие в их проявлении и тяжести течения в зависимости от пола и возраста. Одна из характерных особенностей рассматриваемых болезней — их повышенная частота в определённых семьях (накопление), которая обусловлена генетической конституцией семьи.

Об этом свидетельствуют данные о высокой частоте длительных и тяжёлых форм широко распространённых болезней (гипертоническая болезнь, атеросклероз, аллергия, шизофрения, сахарный диабет, язвенная болезнь, псориаз, врождённые пороки развития). Безусловно, с возрастом увеличивается вклад наследственной предрасположенности в развитие патологии, но и в детском возрасте он немалый. Речь идёт не только о врождённых пороках развития, но и об атопических иммунных состояниях, целиакии, повышенной чувствительности к некоторым пищевым веществам.

НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- Специфические симптомы наследственных болезней
- Множественные патологические изменения органов и систем
- Врождённый характер заболевания
- «Резистентность» к наиболее распространённым методам терапии

Для наследственных болезней, начинающихся в любом возрасте, характерно хроническое течение с прогрессирующей клинической картиной. Многие новые формы наследственных болезней были открыты при обследовании групп лиц с хронической патологией. Хронический процесс при наследственных болезнях развивается в результате постоянного действия мутантного гена. Степень хронизации и прогрессивности одного и того же заболевания различается у разных больных, что объясняется взаимодействием генов (генотип каждого человека индивидуален).

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Разнообразные *признаки дизморфогенеза* являются составной частью многих наследственных и врождённых болезней. Они встречаются практически по всем системам и весьма разнообразны по проявлениям.

- Перечень признаков дизморфогенеза
- 1. Кожа: ангиомы, телеангиэктазии, венозная сеть, пигментные пятна, депигментация, тёмно-коричневые «веснушки» (более 20), гипергрихоз, гирсутизм, липомы, фибромы, келоидные рубцы, повышенная растяжимость, нарушение потоотделения, гиперкератоз.
- 2. Подкожная жировая клетчатка: избыточное отложение, уменьшенное количество.
- 3. Мышцы: гипертрофия, гипотрофия, аплазия.
- 4. Волосы: сухие, редкие, шерстистые; алопеция (тотальная, гнездная), седая прядь надо лбом, «мыс вдовы», низкий рост волос на лбу или на шее.
- 5. Череп: гидроцефалия, микроцефалия, макроцефалия, брахицефалия, долихоцефалия, тригоноцефалия, акроцефалия, выступающий лоб, выступающий затылок, плоский затылок и т.д.

КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД (речь идёт о наблюдении патологических признаков с помощью приёмов клинического обследования. Составление родословной: Обычно родословная собирается по одному или по нескольким признакам).

СИНДРОМОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Если врач осматривает больного полностью, то он может выявить признаки, существенно облегчающие дифференциальную диагностику.

ПАРАКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКЕ

Параклинические исследования занимают существенное место в диагностике наследственных болезней. В настоящее время применяется весь спектр параклинических методов для диагностики наследственных болезней и оценки состояния больного: клинико-биохимические, гематологические, иммунологические, эндокринологические, электрофизиологические, рентгенорадиологические. Более углублённые варианты параклинических обследований составили отдельную группу лабораторно-генетических методов. Клинико-биохимические исследования проводят при муковисцидозе, семейной гиперхолестеринемии, фенилкетонурии, болезни Вильсона—Коновалова.

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ДИАГНОСТИКИ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ (базы данных и
диагностические программы. Их назначение — ускорить и
объективизировать выбор диагноза из множества генетически
разнородных, но клинически сходных синдромов и болезней).

МЕТОДЫ СОВРЕМЕННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДНК

У человека ДНК обычно выделяют из лейкоцитов крови, для чего собирают от 0,5 до 2-3 мл венозной крови. В плазме, обогащенной лейкоцитами, с помощью детергентов производят быстрый лизис клеток. Высвобождение ДНК из хромосом достигается за счет протеолитического разрушения ассоциированных с этими молекулами ядерных белков.

Распространенным методом работы с молекулами ДНК и РНК является электрофорез в полиакриламидном или агарозном гелях. Идентификация ДНК в геле осуществляют путем специфического окрашивания, чаще всего - бромидом этидия или серебром.

Открытие бактериальных ферментов, обладающих эндонуклеазной активностью - рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз, значительно продвинуло исследование структуры ДНК и возможности генно-инженерного манипулирования с молекулами ДНК. Рестриктазы выделяют путем биохимической очистки из различных видов бактерий. В результате действия рестриктаз образуются фрагменты ДНК определенной длины.

Таким образом, при использовании рестриктаз можно получить фрагменты ДНК разной длины, а размеры фрагмента определяют также при электрофорезе в геле. Этот метод позволяет определить молекулярную массу фрагментов

Следующим этапом анализа изолированного фрагмента ДНК является определение нуклеотидной последовательности, то есть секвенирование.

С этой целью создаются наборы матриц - чипы, в ячейках которых иммобилизованы все возможные варианты перестановок из 4-х стандартных нуклеотидов.

Идентификация специфических участков в молекулах ДНК осуществляется с помощью ДНК-зондов. Зондом может служить любая однонитевая ДНК ограниченного размера, используемая для поиска комплементарных последовательностей. Зондами также могут служить выделенные из генома клонированные последовательности ДНК. Идентификацию с помощью ДНК-зондов специфических участков в геномной ДНК проводят после ее рестрикции и электрофоретического разделения образовавшихся фрагментов.

Набор клонированных фрагментов ДНК, полностью отражающих исходную молекулу ДНК, выделенную из какого-либо специфического источника, называют "библиотекой генов". В зависимости от происхождения ДНК различают геномные и ДНК-овые, обычно тканеспецифические, библиотеки генов. Для конструирования геномных библиотек используют тотальную ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови, из культур клеток, эмбриональных тканей и других биологических источников.

Гибридизация с ДНК-зондами и клонирование - очень трудоемкие методы, требуют большого количества ДНК и имеют ряд существенных недостатков и ограничений

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) или специфической амплификации ДНК, изобретенный К. Мюллісом (удостоен за это Нобелевской премии), позволил избирательно синтезировать *in vitro* более миллиона копий любого участка ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов. При этом в качестве матрицы могут быть использованы любые образцы ДНК с частично или полностью известной нуклеотидной последовательностью.

Конкретные методы анализа амплифицированных фрагментов и составляют основу современной клинической ДНК-диагностики, то есть оценки состояния определенного участка гена. Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности, фланкирующей амплифицируемую область ДНК, так как специфический выбор этого участка осуществляется путем гибридизации матричной ДНК с двумя праймерами - искусственно синтезированными молекулами ДНК, размером обычно от 15 до 30 пар оснований, комплементарных 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК.

ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, используя для этого специальные приборы - амплификаторы. Такой прибор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры для каждой процедуры.

В техническом исполнении ПЦР достаточно проста. Все компоненты реакции (матричную ДНК, праймеры, смесь дезокситрифосфатов и термофильную ДНК-полимеразу) добавляют в специфический буфер, помещают в амплификатор и выбирают необходимую программу циклической смены температуры и длительности каждого шага реакции. Для проведения реакции не требуется большого количества ДНК. Метод ПЦР позволяет проводить прямую диагностику мутаций в генах для сотен моногенных наследственных заболеваний. Этот метод является ключевым для расшифровки генетических основ предрасположенности к наиболее частым мультифакториальным болезням. На ПЦР основаны современные методы диагностики бактериальных и вирусных инфекций, позволяющие обнаруживать присутствие инфицирующих агентов вне зависимости от их активности.

ПЛАН ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ:

1. Предмет и задачи медицинской генетики.
2. Место и роль медицинской генетики в изучении патологии человека.
3. Человек как объект генетического анализа.
4. Современные представления об организации и функционировании генома человека.
5. Генотип как целостная система. Типы взаимодействия генов.
6. Методы изучения наследственной патологии:
 - а./ клинико-генеалогический,
 - б./ близнецовый,
 - в./ популяционно-статистический,
 - г./ цитогенетический,
 - д./ биохимический,
 - е./ молекулярно-генетический.
7. Взаимодействие наследственных и средовых факторов в формировании патологических процессов.
8. Классификация наследственных болезней.
9. Клинический полиморфизм наследственных болезней и его причины.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лекции.
2. Клиническая генетика. Н.П. Бочков. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004, стр. 11-55, 62-69, 109-123, 323-359.
3. Клиническая генетика. Н.П. Бочков. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001, стр. 7-31, 45-51, 53-102, 247-272.
4. Медицинская генетика. Е.К. Гинтер. - М.: Медицина, 2003, стр. 28-50, 121-125, 200-321.
5. Основы клинической генетики. Г.Р. Мутовин. - М.: Высшая школа, 2001, стр. 6-29, 53-69, 102-119.
6. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. В.Н. Горбунова, В.С. Баранов. – СПб.: Спец. литература, 1997, стр. 14-65.