Основи генетики людини.

Методи вивчення спадковості.

Питання теми:

1. Основи медичної генетики. Особливості генетики людини.

2. Методи вивчення спадковості людини: генеалогічний метод; популяційно–генетичний метод; близнюковий метод; метод дерматогліфіки; цитогенетичний метод; імуногенетичний метод; біохімічний метод.

3. Експериментальні методи: гібридизації соматичних клітин, генної інженерії. Методи моделювання. ДНК-аналіз.

4. Значення цих методів для медико–біологічних досліджень та медицини.

Генетика людини вивчає:

- явища спадковості та мінливості у популяціях людей;
- особливості успадкування нормальних та патологічних ознак;
- залежність захворювань від генетичної схильності та факторів середовища;

Генетика людини – одна з найважливіших теоретичних основ медицини. Академік І.П. Павлов писав: «Наші лікарі повинні як абетку знати закони спадковості…».

Особливості генетики людини

- Неможливість експериментального схрещування.
- Повільна зміна поколінь.
- Невелика кількість нащадків у кожній родині.
- Складний каріотип. Велика кількість груп зчеплення (24).
- Багато ознак є полімерними, або спостерігається плейотропія.
- Значний вплив факторів середовища на експресивність та пенетрантність ознаки.

Основні методи вивчення спадковості людини:

- генеалогічний метод;
- популяційно–генетичний метод;
- близнюковий метод;
- метод дерматогліфіки;
- цитогенетичний метод;
- імуногенетичний метод;
- біохімічний метод;
- експериментальні методи (гібридизації соматичних клітин, генної инженерії, методи моделювання, ДНК-аналіз).

Генеалогічний метод. (Ф.Гальтон,1865)

Генеалогічний метод дозволяє встановити:

1. характер успадкування ознаки;
2. тип успадкування (А-Д, А-Р, Х-Д, Х-Р);
3. зиготність пробанда та інших членів родоводу;
4. ймовірність появи ознаки у пробанда, його майбутніх дітей;
5. експресивність та пенетрантність ознаки (при аналізі багатьох родоводів за однаковою ознакою);
6. по якій лінії (батьківській або материнській) передається ознака.

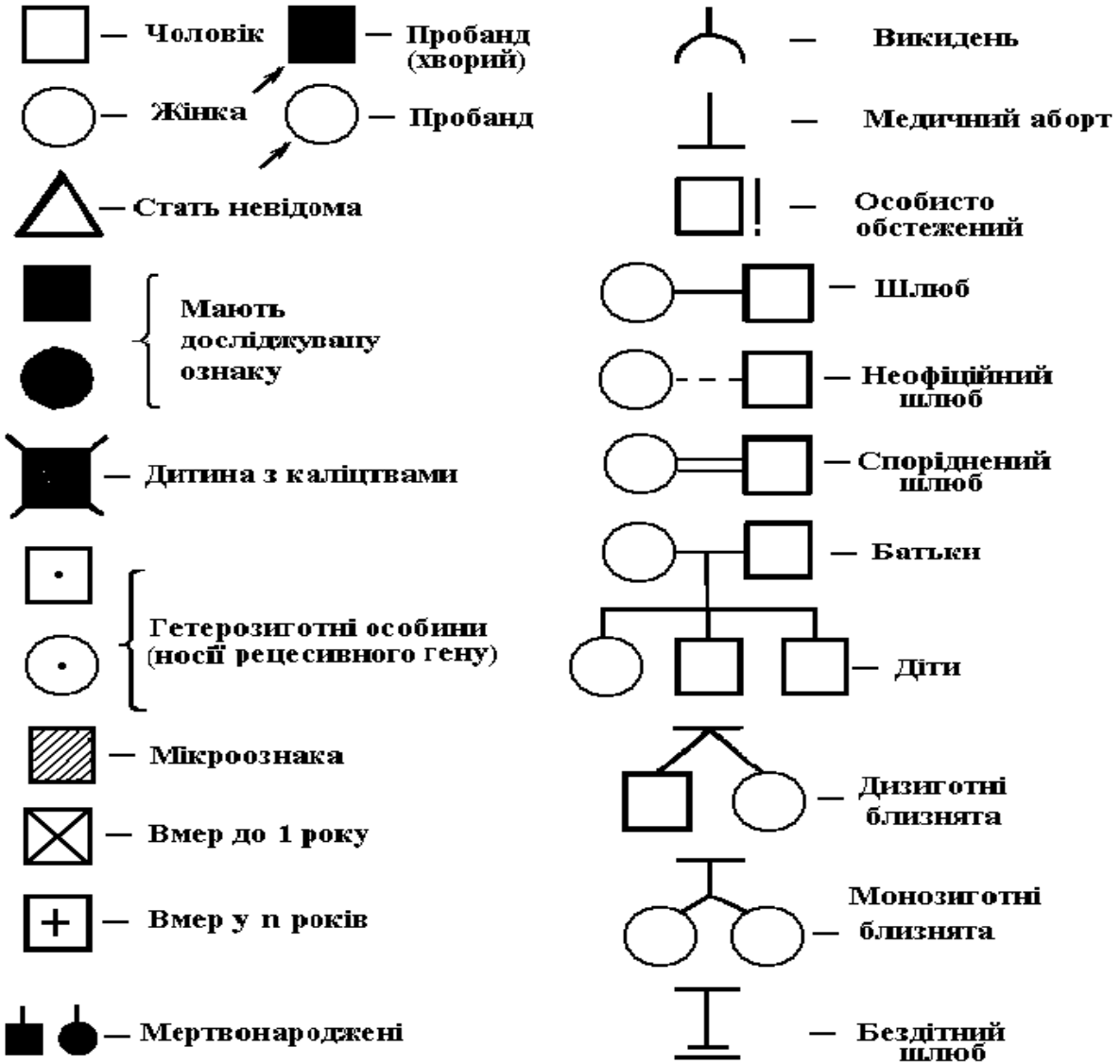
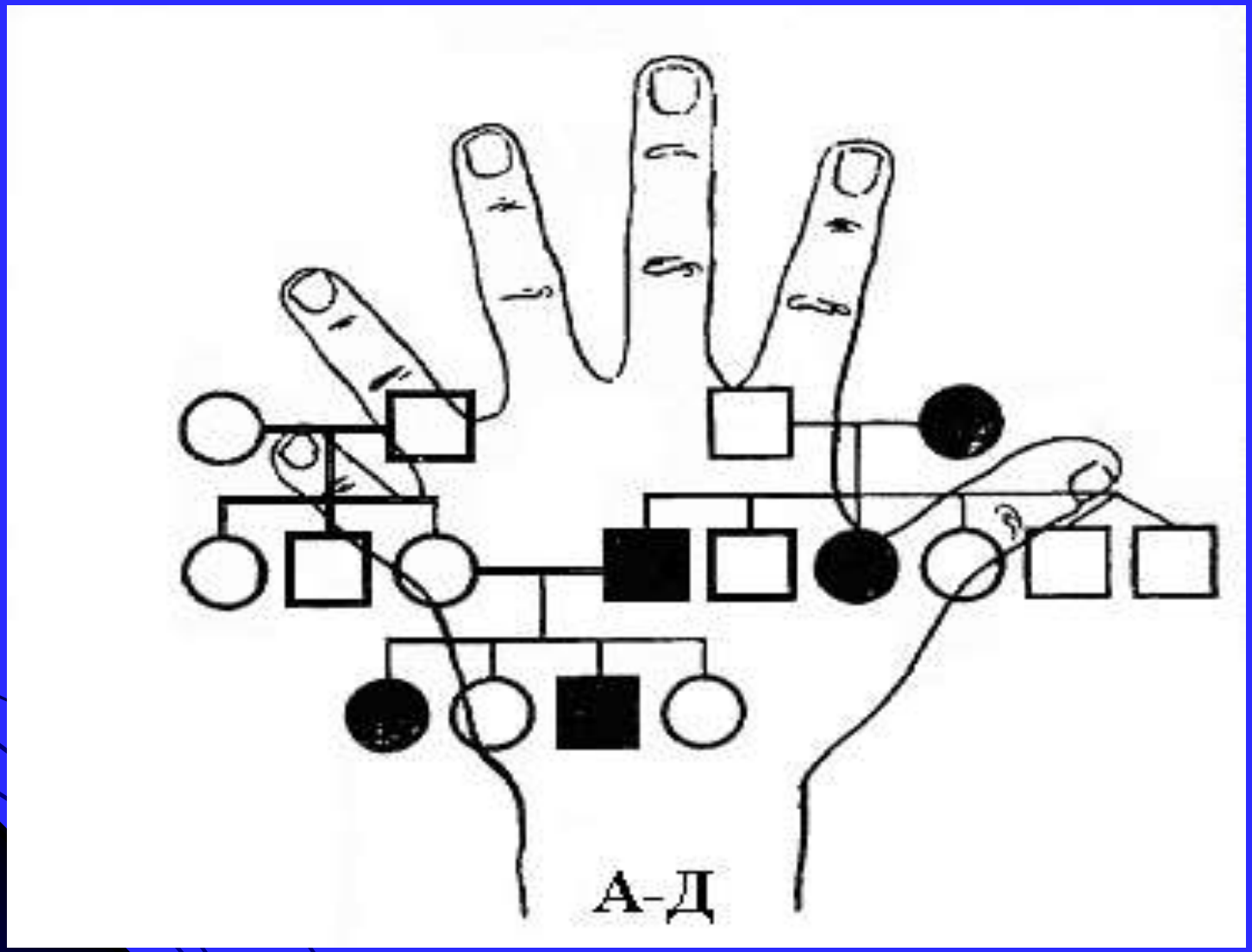
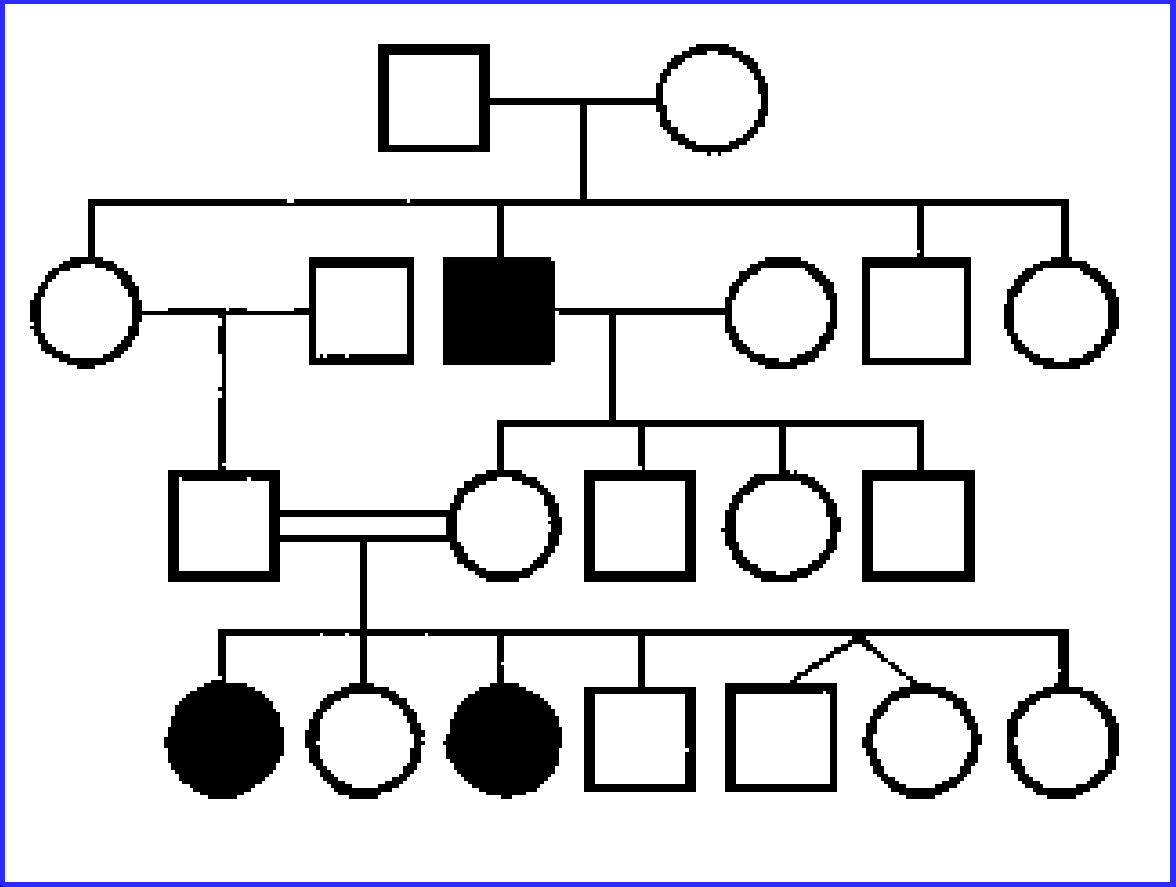


Рис. 1. Стандартні символи для складання родоводів


А-Д

Аутосомно-домінантний тип успадкування характеризується такими ознаками:

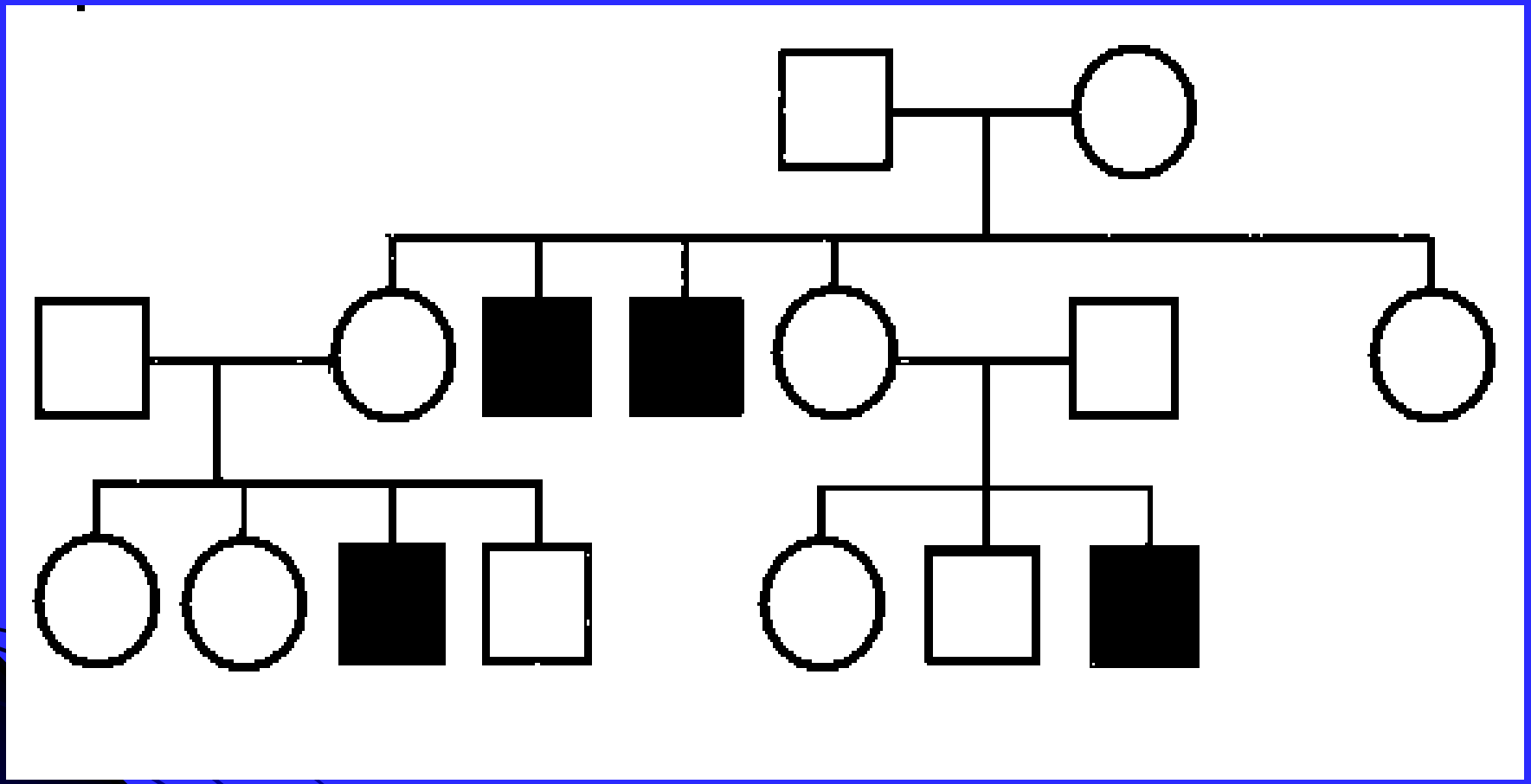
1. Ознака спостерігається в родоводі по вертикалі (передається із покоління в покоління). При відносно великій кількості сибсів – і по горизонталі.
2. Хворіють особини чоловічої та жіночої статі в однакової мірі.
3. Один з батьків, як правило має ознаку (хворий).
4. Ймовірність прояву ознаки у нащадків становить 50%-100% (при гетерозиготності одного з батьків – 50%, 75% - при гетерозиготності двох батьків, 100% - при гомозиготності одного з батьків).
5. У особин без визначеної ознаки, як правило вона у нащадків не проявляється (при умові неповної пенетрантності і варіабельної експресивності може передаватися через покоління).



A-P

Аутосомно-рецесивний тип успадкування характеризується такими ознаками:

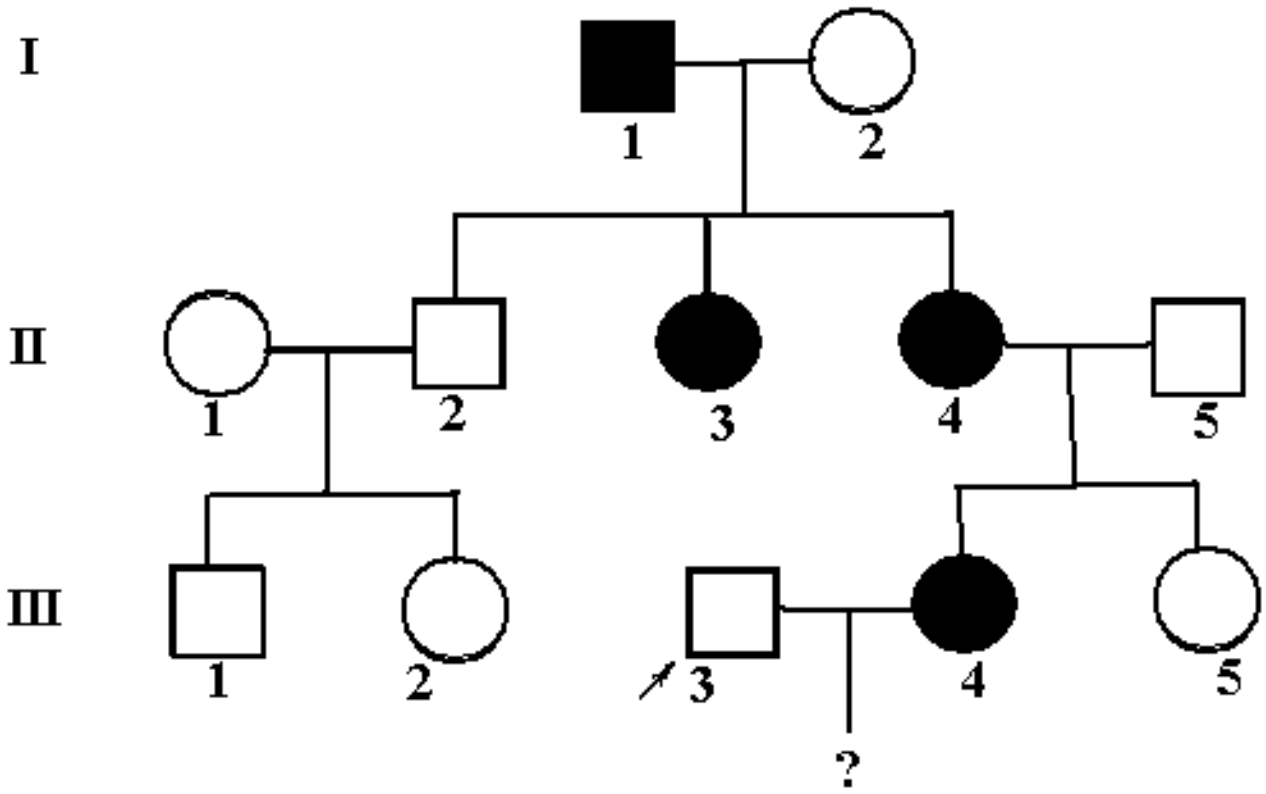
1. Ознака спостерігається в родоводі по горизонталі (хворіють сибси – рідні, двоюрідні).
2. Хворіють особини чоловічої та жіночої статі в однакової мірі.
3. Батьки хворої дитини частіше фенотипово здорові(гетерозиготні носії мутантного гену).
4. Ймовірність прояву ознаки у нащадків становить 25% (при гетерозиготності двох батьків).
5. При прояві А-Р ознак часто спостерігається кровна спорідненість батьків хворого (яка може бути невідомою членам сім'ї).



X-P

Х-зчеплений рецесивний тип успадкування характеризується такими ознаками:

1. Ознака спостерігається в родоводі по горизонталі та вертикалі, часто через покоління, хворіють сибси – рідні, двоюрідні, родичі з боку матері (дядьки пробанда).
2. Хворіють переважно особини чоловічої статі.
3. Батьки хворої дитини частіше фенотипово здорові, можуть бути хворі з боку матері (жінки гетерозиготні носії мутантного гену).
4. Ймовірність прояву ознаки у нащадків становить 25% (при гетерозиготності матері, від гемізиготного батька ознака передається донькам, але фенотипові у них не проявляється).
5. Деякі ознаки в рідких випадках можуть проявлятися у жінок (не летальні ознаки, наприклад, дальтонізм).



Х-Д

Х-зчеплений домінантний тип успадкування характеризується такими ознаками:

1. Ознака однаково проявляється як у чоловіків, так і у жінок.
2. Ознака проявляється в гетерозиготному стані у жінок, у чоловіків – в гемізиготному стані.
3. Ймовірність появи ознаки у дітей становить 25-50% при гетерозиготності одного з батьків.
4. Жінка може передавати цей ген половині дочок і половині синів (при генотипі — X^AX^a, імовірність передавання Х-хромосоми з домінантним мутантним геном - 50%).
5. Гемізиготні чоловіки ($X^AУ$) передають цей ген з Х-хромосомою тільки усім дочкам, сини, які мають у своєму генотипі тільки одну материнську Х-хромосому, цей ген від батька успадкувати не можуть (ймовірність успадкування ознаки – 25%).

Близнюковий метод.
(Ф.Гальтон, 1976; Г. Сименс, 1924)

Для використання близнюкового методу потрібне:

- Достатня кількість близнюкових пар.
- Досліджувати монозиготних та дизиготних близнюків.
- Ідентифікація близнюків.
- Використовувати надійні критерії зиготності (морфологічні, біохімічні, імунологічні, дерматогліфіку).

Для ідентифікації близнюків застосовують слідуючи методи:

1. Полісимптомний метод Г. Сименса (фенотипові показники: пігментація, форма вушної раковини, носа, губ, тіла, папілярні візерунки.
2. Ідентифікація за еритроцитарними ізоантигенами, які мають 100% пенетрантність.
3. Дослідження слини та смаку (чутливості до фенілтіокарбаміду).
4. Електрофорез сироватки крові.
5. Реакція бласт-трансформації в змішаній культурі лімфоцитів.
6. Трансплантантний тест (перехресна пересадка шкіри).
7. Анкетний метод.

Близнюковий метод дозволяє встановити:

- значення генотипу та факторів середовища у визначенні ознак,
- експресивність та пенетрантність ознаки,
- ефективність лікування при деяких захворюваннях.

H – коефіцієнт спадковості

E – коефіцієнт значення факторів середовища у визначенні ознаки.

$$H + E = 1$$

Формула Хольцингера:

$$H = \frac{K\,MZ - K\,DZ}{1 - K\,DZ}$$

Конкордантність (%) деяких ознак людини у близнюків (MZ, DZ).

Ознаки	MZ	DZ
Нормальні		
Групи крові АВО, Rh	100	46
Колір очей	99,5	28
Колір волосся	97	23
Папілярні візерунки	92	40
Активність карбоангідрази	79	47
Патологічні		
Діабет	84	16
Коронарний тромбоз	26	13,8
Клишоногість	32	3
Артеріальна гіпертонія	25	9,4
Розщілина губи	33	5
Природжений вивих	41	3
Паралітичний поліомієліт	36	6
Бронхіальна астма	19	4,8
Кір	98	94
Епідемічний паротит	82	74
Туберкульоз	37	15
Дифтерит	50	38
Епілепсія	67	3
Шизофренія	70	13
Гіпертонія	26,2	10
Ревматизм	20,3	6,1

Популяційно-генетичний метод.
(Дж. Харди, В. Вейнберг,1908)
(С.Четверіков, Р.Фишер, Б. Холдейн, С. Райт)

Напрямки вивчення:

- Аналіз генетичного складу популяцій людини.
- Аналіз причин, які приводять до змін генофонду.

Дозволяє визначити:

- генофонд та алелофонд популяцій людини;
- частоти генів та їх алелів в популяціях;
- визначити генетичний поліморфізм популяцій;
- частоти певних мутантних генів, алелів в популяції;
- частоти виникнення нових мутацій.

Генетичний склад популяцій людини визначається:

- системою шлюбів,
- факторами, які змінюють частоти генів.

Закон Харді-Вайнберга (1908)

Частоти генів в ідеальних популяціях із покоління в покоління залишаються незмінними.

Співвідношення Харді-Вайнберга

$$p + q = 1$$

$$(p + q)2 = 1$$

де p – частота домінантного алеля гена (A),
q – частота рецесивного алеля (a).

Для вивчення частот поліморфних генів використовують співвідношення:

$$p + q + r = 1$$

$$(p + q + r)2 = 1,$$

де p, q, r – поліморфні гени

Біохімічний метод.

Класифікація ВООЗ спадкових хвороб – порушень обміну речовин:

1. **порушення обміну амінокислот (фенілкетонурія, тирозиноз, альбінізм, алькаптонурія);**
2. **порушення обміну вуглеводів (галактоземіяія, фруктоземія);**
3. **порушення обміну ліпідів (ліпідози);**
4. **порушення стероїдного обміну;**
5. **порушення обміну пуринів та піримідинів;**
6. **порушення обміну речовин у сполучній тканині, м'язах та кістках;**
7. **порушення обміну структури гема та порфірина;**
8. **порушення обміну в еритроцитах та порушення їх структури;**

9. аномалії обміну металів;
10. порушення транспорту різних речовин (дефекти транспорту);
11. порушення структури та функцій ферментів та білків плазми.

Спадкові дефекти можуть бути діагностовані:

- шляхом визначення порушення структури білків (гемоглобінів, ферментів), які утворилися внаслідок мутації;
- при визначенні проміжних продуктів обміну (дериватів або мінорних речовин), які є наслідком генетичного блоку певної реакції обміну (для діагностики ензимо- або ферментопатій).

Метод дерматогліфіки
(Ф. Гальтон, 1892).

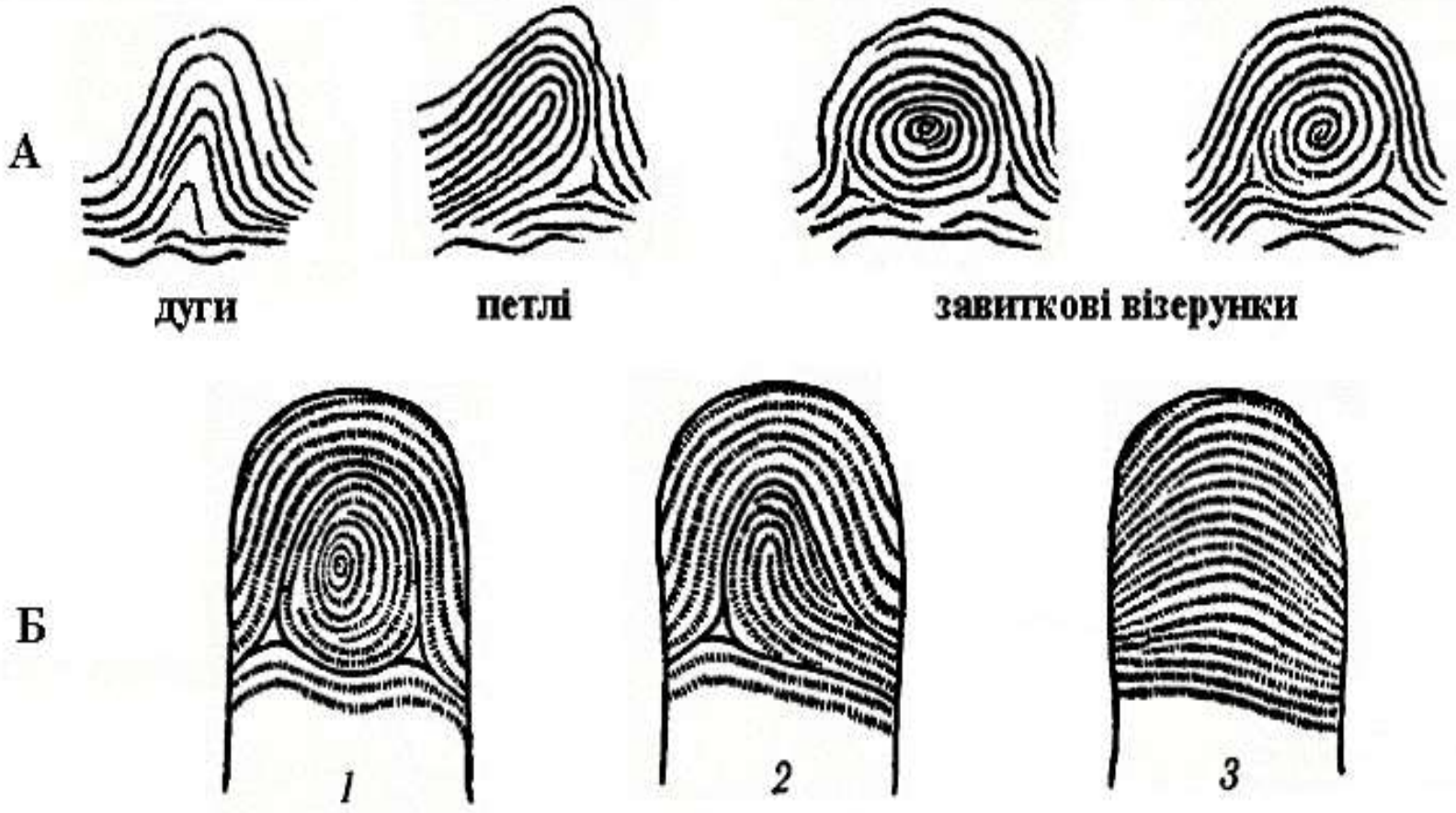
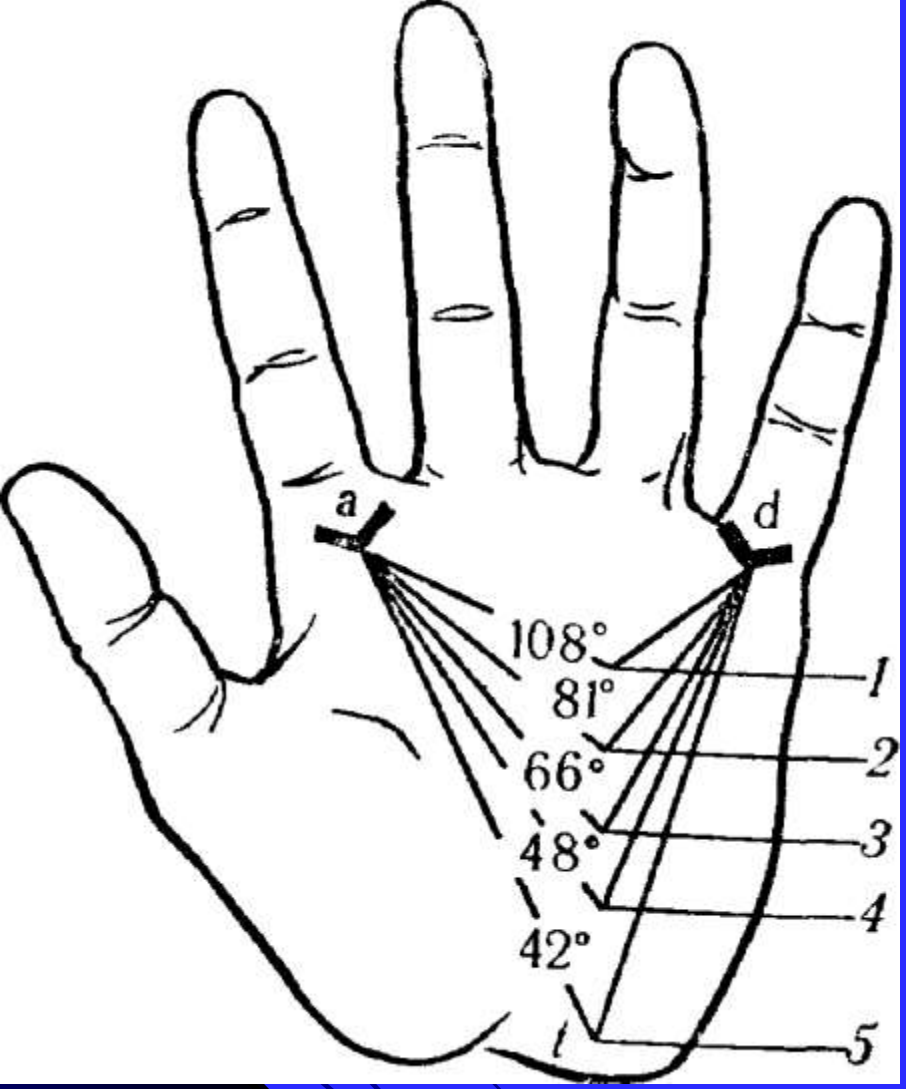


Рис.6. Варіанти візерунків пальця:

А– відбитки; Б – схематичне розташування гребінців ліній та трирадіусів :
1 - концентричний узор; 2 - петля; 3 - дуга.



Кут *atd* в нормі і при хромосомних хворобах:

1 — синдром Патау;
2 — синдром Дауна;
3 — синдром Шерешевського-Тернера;
4 — норма;
5 — синдром Клайнфельтера.

Цитогенетичний метод.

- В 1956 році Дж.Тійо і А. Леван запропонували нову методику вивчення каріотипу людини, також встановили кількість хромосом в каріотипі людини.
- Т. Касперсон (1969) розробив методику диференційного забарвлення хромосом.

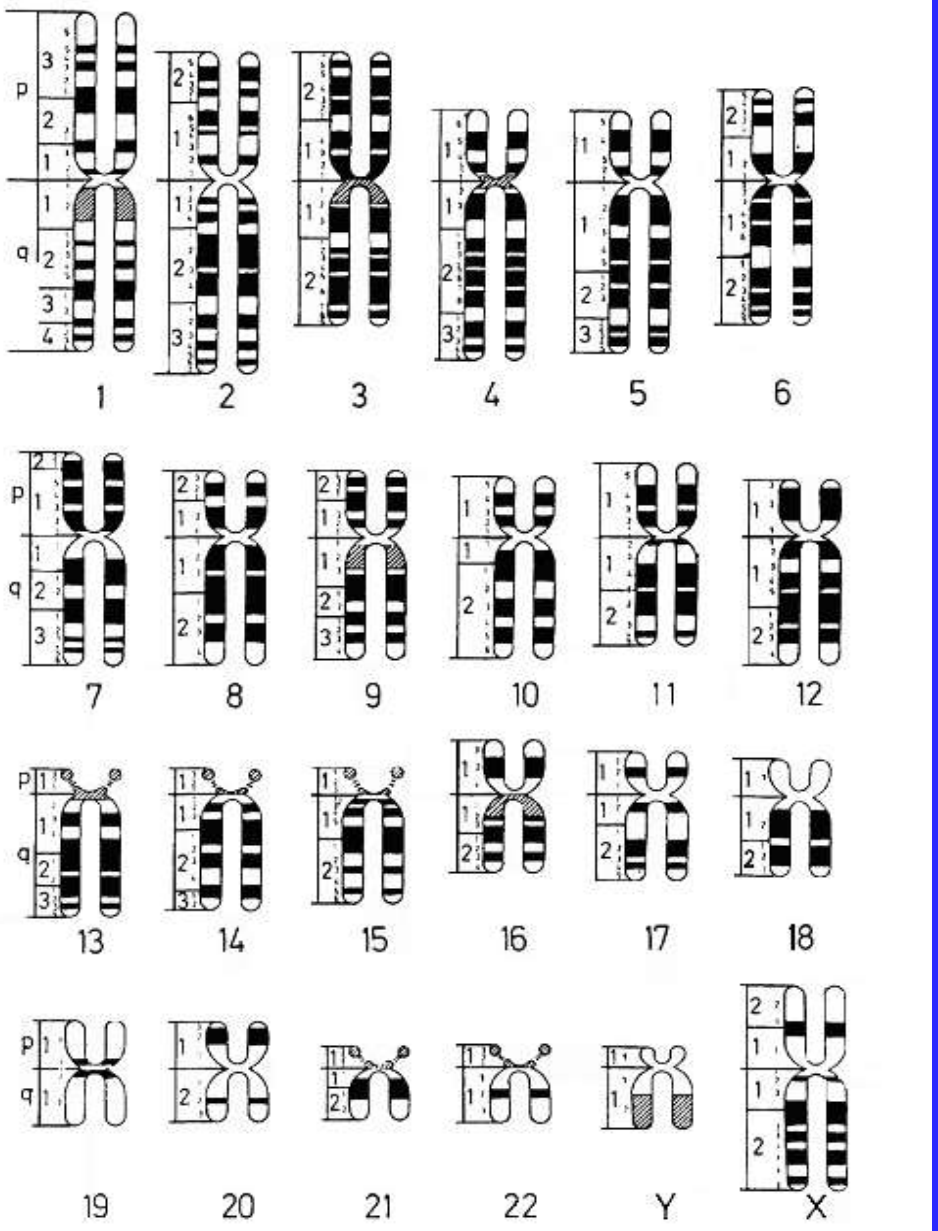
Цитогенетичний метод включає:

а) каріотипування (встановлення та аналіз каріотипу);

б) диференційне забарвлення хромосом;

в) визначення статевого хроматину (У–хроматину, Х–хроматину).

Метафазна пластинка

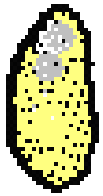
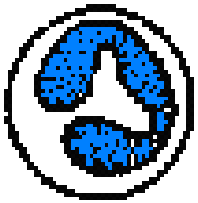
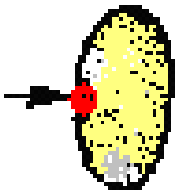
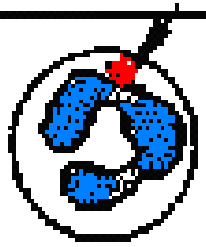
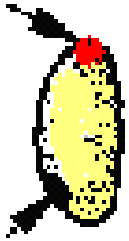
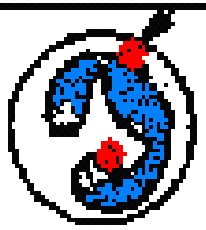
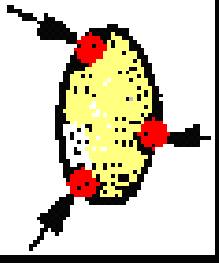
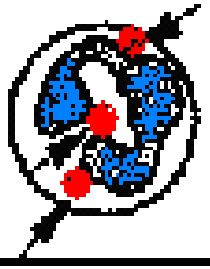


Сегментація хромосом людини відповідно до Паризької номенклатури.

Позитивні G-, Q-сегменти;

негативні (чорні) - R-сегменты,

заштриховані – варіабельні сегменти.

Кількість Х хромосом	А	Б	Каріотип
Одна Х - хромосома			Чоловік - 46, XY Жінка - 45, XO (синдром Тернера Шерешевського)
Дві Х - хромосоми			Жінка - 46, XX Чоловік - 47, XXY (синдром Клайнфельтера)
Три Х - хромосоми			Жінка - 47, XXX (трисомія Х) Чоловік - 48, XXXY (синдром Клайнфельтера)
Чотири Х хромосоми			Жінка - 48, XXXX (полісомія Х) Чоловік - 49, XXXXY (синдром Клайнфельтера)

Цитогенетичний метод дозволяє встановити:

- а) кількість хромосом у каріотипі;
- б) генетичну стать організму;
- в) наявність хромосомних аберацій та їх локалізацію.

Все це дозволяє діагностувати хромосомні хвороби людини.

Методи генетики соматичних клітин.

Для генетичних досліджень використовують:

1. вирощування культури клітин;
2. клонування;
3. селекцію клітин;
4. гібридизацію клітин.

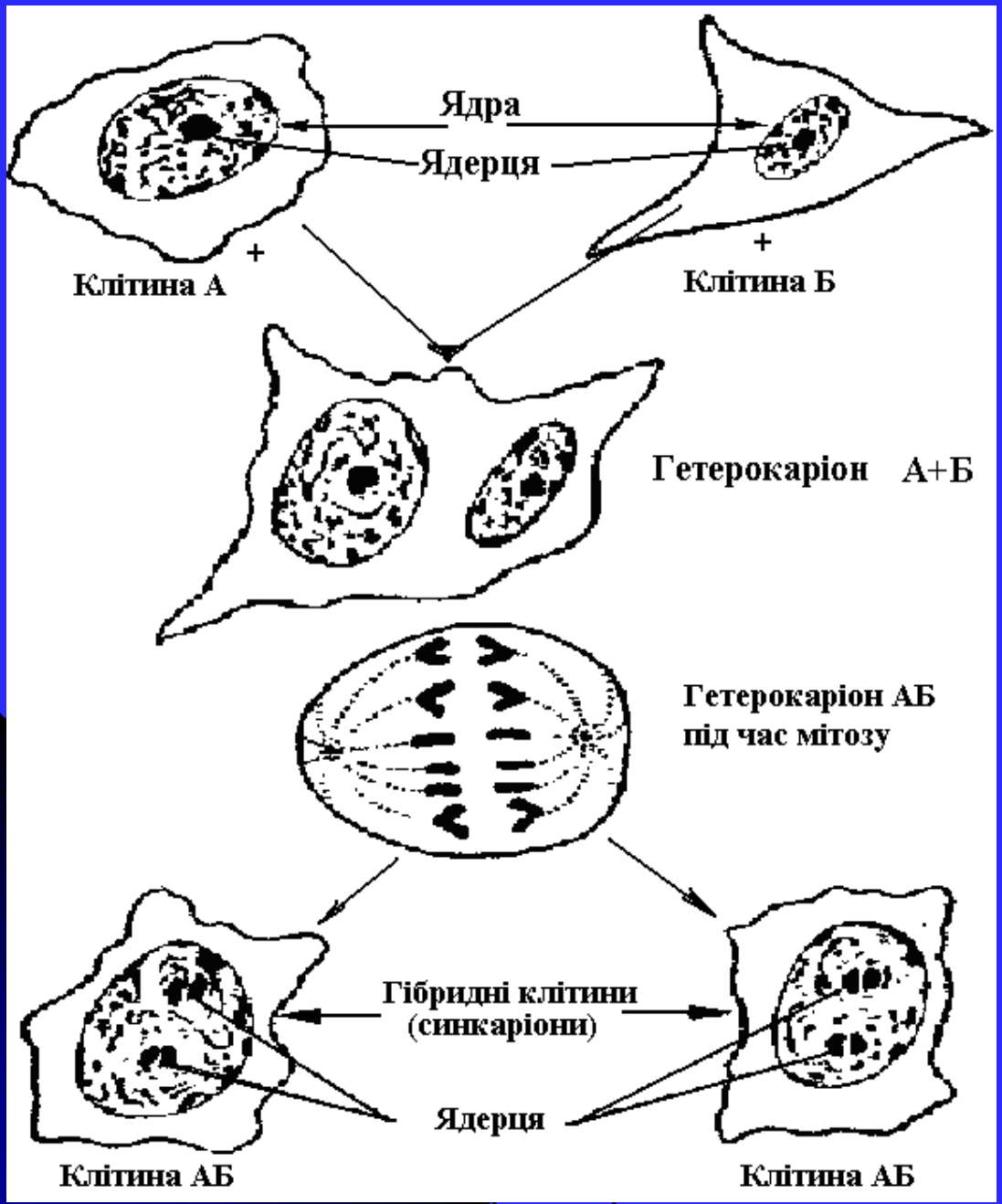


Схема гібридизації соматичних клітин з утворенням синкаріонів

(гетерокаріонів).

Методи генетики соматичних клітин дозволяють:

- вивчати зчеплення генів та їх локалізацію в хромосомах;
- встановити первинну дію генів та їх взаємодію;
- встановити генетичну гетерогенність спадкової патології;
- діагностувати спадкову патологію в пренатальному періоді.

Імуногенетичний (імунологічний) метод.

Це метод вивчення генетичних закономірностей з використанням імунологічних реакцій (взаємодія антиген - антитіло з утворенням комплексів).

Для досліджень використовуються:

- біологічні рідини (кров, слина, спинно – мозкова рідина) і тканини;
- культури клітин (HLA, залоз внутрішньої секреції, кісткового мозку, лейкоцитів).

Для встановлення відповідних генів визначають їх генетичні маркери (детермінанти) — антигени.

Імуногенетичний метод дозволяє вивчати:

- генетичну детермінованість та поліморфізм імунних систем;
- генетику імуноглобулінів та системи комплімента;
- генетику комплексу гістосумісності, трансплантаційних антигенів факторів імунорегуляції;
- генетику системи HLA людини і генетичне визначення резистентності до хвороб, які залежать від даної системи;
- поліморфізм еритроцитарних антигенів та генетику груп крові.

Молекулярно – генетичні методи:

- метод секвенирування,
- зворотної транскрипції ДНК,
- розмноження (клонування) окремих фрагментів ДНК шляхом включення їх в бактеріальні плазміди.

Такі методи дозволяють:

- вивчати генетичний матеріал (послідовність генів в ДНК);
- визначати локалізацію порушень на молекулярному рівні (генні мутації);
- визначати нуклеотидну послідовність ДНК та генів;
- розмножувати структурні гени (клонування) шляхом включення в бактеріальну клітину;
- рекомбінувати молекули ДНК для одержання необхідних речовин (генна інженерія) на основі генів людини;
- визначати точну локалізацію генної мутації (ДНК–зонди).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Кері Мюлліс

Нобелівський лауреат з хімії, 1993р.

- Метод створено К. Мюллісом у 1983 р.
- Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод ампліфікації певної ділянки ДНК чи РНК *in vitro*
- Під час ПЛР багатократно повторюють синтез певної ділянки ДНК. Метод дає змогу розмножити певні молекули ДНК до мільйонів копій (мікрограмових кількостей) навіть тоді, коли у вихідному зразку є лише одна копія цієї молекули
- Використовують ДНК-полімеразу та олігонуклеотидні праймери, що комплементарні до 3'-кінців фрагмента матриці, який хочуть ампліфікувати

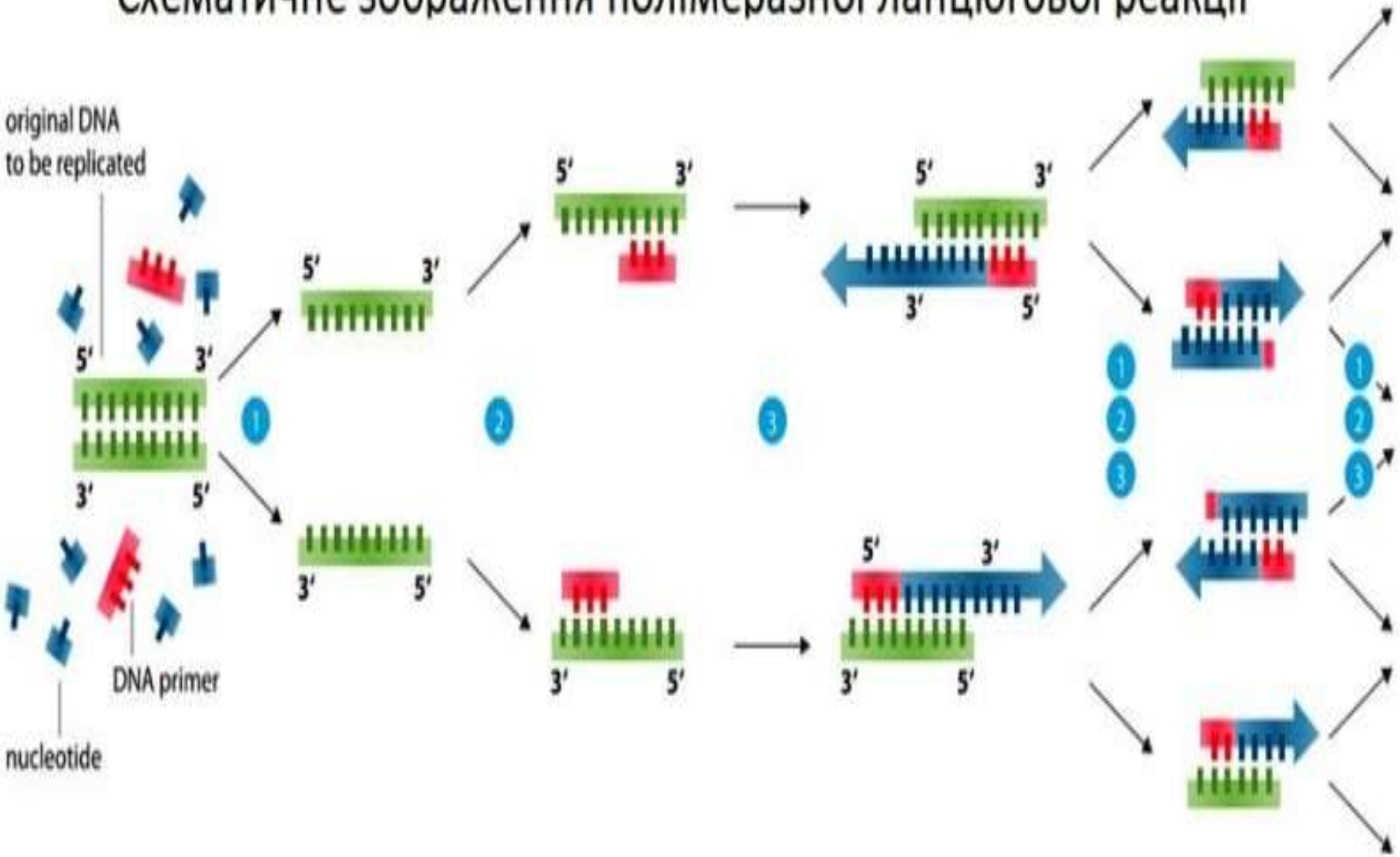
- ***Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)*** - експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) у біологічному матеріалі (пробі).
- В основі методу ПЛР лежить багаторазове подвоєння певної ділянки ДНК за допомогою ферментів у штучних умовах (in vitro). В результаті напрацьовується кількість ДНК, достатня для візуальної детекції. При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і тільки в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку.

- Для розуміння механізмів ПЛР необхідно відзначити властивість ДНК, яка є основою ПЛР, – це можливість ДНК денатуруватися (при плавленні) та ренатуруватися (при відпалюванні). Тобто, при нагріванні дволанцюгові молекули ДНК розплітаються та утворюють 2 окремі ланцюги, а при охолодженні відбувається їхня ренатурація – знову з'єднуються 2 ланцюги за принципом комплементарності.
- Крім простого збільшення кількості 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 та медичній практиці, наприклад, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних) для встановлення батьківства, для клонування генів, введення мутацій, виділення нових генів.

Стадії ПЛР

- **Денатурація (94°С):**
  - **Розділення ниток матриці ДНК;**
- **Гібридизація (відпал) праймерів на матриці (40-65°С):**
  - **Праймери є затравками для подальшого синтезу за участі ДНК-полімераз;**
- **Синтез комплементарних ланцюгів (72°С).**

Основні принципи ПЛР: Узагальнення

- Ампліфікація необхідного фрагмента ДНК відбувається між двома праймерами (праймери входять до складу ПЛР-продукту);
- Ампліфікацію проводят протягом 30-40 циклів (для клонування – бажано не більше 28 циклів):
- Кожний цикл складається з трьох основних температурних режимів (але може бути і два, наприклад - 94 °С і 67 °С);
- В реакції використовують термостабільні ДНК-полімерази;
- За 30 циклів відбувається збільшення копій заданого фрагмента ДНК в 1 000 000 000 разів;
- Кінетика накопичення продукту ПЛР-реакції характеризується виходом на «плато».

Схематичне зображення полімеразної ланцюгової реакції