

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

МЕТОДЫ АНТРОПОГЕНЕТИКИ

Учебное пособие

**Уфа
2016**

УДК 572.1/.4.08(075.8)

ББК 28.71 я 7

М 54

Рецензенты:

Д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики
ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ» МЗ РФ *Р.Р. Исламов*

Д.б.н., старший научный сотрудник Института биохимии и генетики
УНЦ РАН *Г.Ф. Корытина*

Методы антропогенетики: учебное пособие /сост.: Г.И. Лукманова,
М 54 С.М. Измайлова, Ф.Ф. Мусыргалина, К.В. Данилко, Г.М. Исхакова,
Д.Н. Куватова, А.Т. Волкова, Т.В. Викторова. – Уфа: Изд-во ФГБОУ ВО
БГМУ Минздрава России, 2016. – 74 с.

Учебное пособие подготовлено на основании рабочей программы по дисциплине «Биология» (2015 г.), действующего учебного плана ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава РФ (2015 г.), в соответствии с требованиями ФГОС ВО по специальности 31.05.02 – Педиатрия (утвержденный 17.08.2015 Министерством образования и науки РФ, №853).

Учебное пособие предназначено для самостоятельной внеаудиторной работы студентов и содержит информацию по основным вопросам антропогенетики. Издание включает теоретический материал о современных генетических методах, тестовые задания и ситуационные задачи с эталонами ответов.

Рекомендовано в печать по решению Координационного научно-методического совета и утверждено решением Редакционно-издательского совета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

УДК 572.1/.4.08(075.8)

ББК 28.71 я 7

© ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Цель и задачи антропогенетики.....	5
Генеалогический метод.....	7
Цитогенетический метод.....	19
Методы генетики соматических клеток.....	33
Близнецовый метод.....	34
Популяционно-статистический метод.....	38
Дерматоглифический метод.....	43
Биохимический метод.....	46
Метод биологического моделирования.....	49
Иммуногенетический метод.....	50
Молекулярно-генетические методы.....	52
Медико-генетическое консультирование.	
Пренатальная диагностика и наследственная патология плода.....	67
Тестовые задания.....	70
Рекомендуемая литература.....	73

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее важных дисциплин в медицинском образовании является медицинская генетика, или антропогенетика. Она раскрывает биологические основы наследственных заболеваний человека. Знание генетической природы патологии человека позволяет понять этиологию и патогенез многих заболеваний, поставить точный диагноз, прогнозировать характер течения, вовремя осуществить индивидуальное лечение. Фундаментальными проблемами антропогенетики являются: разработка новых высокоэффективных методов диагностики, лечения и профилактики наследственно обусловленной патологии.

В последние десятилетия антропогенетика бурно развивается. Наибольший прогресс отмечается в области молекулярной генетики человека. В настоящее время разрабатываются новые методы анализа ДНК, выявляются первичные дефекты генов ряда заболеваний, решаются вопросы генной инженерии и генотерапии.

Достижения генетики используются при изучении проблем иммуногенетики, трансплантации органов и тканей, онкологии, биотехнологии, гигиенической оценки окружающей среды, в определении индивидуальной реакции на введение лекарств.

Знания антропогенетики необходимы врачу любой специальности. Изучение основ антропогенетики позволит педиатру лучше понять природу происхождения врожденной патологии, разработать рациональный подход к диагностике и лечению пороков развития у детей.

Данное учебное пособие содержит информацию о современных методах, используемых для изучения наследственности и изменчивости у человека. Эти знания будут востребованы в приобретении практических навыков при диагностике генетической патологии у человека.

Учебное пособие направлено на формирование **компетенций**:

- готовность к саморазвитию, самореализации, самообразованию, использованию творческого потенциала (**ОК-1**);
- готовность решать стандартные задачи профессиональной деятельности с использованием информации, медико-биологической терминологии (**ОПК-1**);
- способность выявлять у пациентов основные патологические симптомы и синдромы заболеваний (**ПК-6**).

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ АНТРОПОГЕНЕТИКИ

Антропогенетика («antropos» – от греческого человек) – раздел генетики, изучающий закономерности наследственности и изменчивости, особенности проявления признаков у человека в норме и их изменение при действии биотических, абиотических, антропогенных факторов окружающей среды. Основоположник отечественной антропогенетики С.Н. Давиденков, разработал принципы работы медико-генетических консультаций, провёл анализ наследственных заболеваний человека в России, изучал проблемы диагностики и профилактики наследственных заболеваний нервной системы.

В настоящее время генетика человека имеет ряд самостоятельных разделов: цитогенетика, биохимическая и молекулярная генетика, радиационная генетика, иммуногенетика, фармакогенетика, популяционная генетика.

Цель антропогенетики - разработка методов диагностики, лечения и профилактики наследственной патологии человека.

Предмет изучения антропогенетики - наследственные болезни, генетические факторы, обуславливающие патологию у человека.

Объект изучения медицинской генетики - человек.

Человек - специфический объект для генетического анализа. Изучение генетики человека связано с большими трудностями, которые обусловлены:

1) сложным кариотипом - большое число хромосом (23 пары, 46 хромосом) и групп сцепления (23 и 24 у женщин и мужчин соответственно). Число генов по последним данным составляет примерно 25 - 30 тыс.;

2) поздним половым созреванием (11-13 лет у девочек и 14-16 лет у мальчиков);

3) редкой сменой поколений (около 30 лет);

4) малого количества потомков;

5) невозможностью экспериментирования;

6) невозможностью создания одинаковых условий жизни для всех членов изучаемой семьи.

Задачи антропогенетики:

1) изучение типов наследования признаков и свойств человека в ряду поколений;

2) разработка методов ранней диагностики наследственной патологии путем совершенствования пренатальной и экспресс-диагностики;

3) широкое внедрение медико-генетического консультирования;

4) определение локализации генов человека;

5) совершенствование и разработка новых методов генной терапии наследственных заболеваний;

б) выявление генетически опасных факторов внешней среды.

Несмотря на перечисленные трудности, генетика человека изучена на сегодня лучше, чем генетика многих других организмов (например, млекопитающих) благодаря потребностям медицины и разнообразным современным методам исследования. Разработано большое число специальных методов изучения наследственности и изменчивости у людей, позволяющих компенсировать вышеприведенные трудности. Основные методы исследования генетики человека, применяемые в настоящее время в отечественной медицине:

- генеалогический;
- близнецовый;
- популяционно-статистический;
- цитогенетический;
- генетики соматических клеток;
- биохимический;
- молекулярно-генетические;
- математического и биологического моделирования;
- дерматоглифический;
- иммуногенетический.

ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

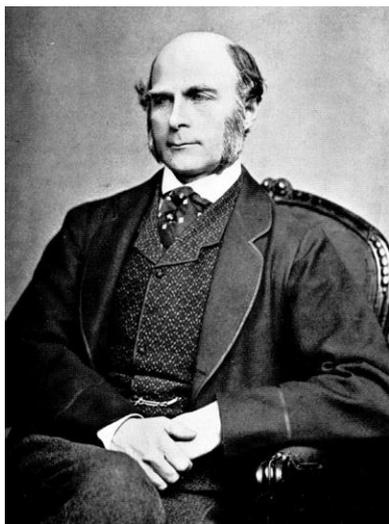


Рис. 1. Сэр Фрэнсис Гальтон (1822 г.-1911 г.)

Генеалогический метод (от слова «генеалогия» - учение о родословных) был введен в 1883 г. сэром Ф. Гальтоном (рис. 1). Родословная – это схема, отражающая родственные связи между членами одной семьи. Генеалогический метод основывается на построении родословных и прослеживании передачи определенного признака или болезни среди близких и дальних, прямых и непрямых родственников, то есть в ряду поколений.

Правила составления родословных

Человек, с которого начинается составление родословной называется *пробандом*. Родные братья и сестры пробанда называются *сибсами*. Дети, у которых общая мать, но разные отцы, называются *единоутробными*, а у которых общий отец, но разные матери – *единокровными сибсами*. Если в семье имеются дети от разных браков, причем, у них нет кровного родства, то их называют *сводные* (например: дети от первого брака матери и отца).

Построение родословного дерева начинают с самого старшего поколения. Каждое поколение располагают в отдельной строке, и обозначают римской цифрой. Все члены семьи должны располагаться по поколениям строго в один ряд. В родословной арабскими цифрами нумеруют слева направо всех членов одного поколения.

Поэтому все члены родословной имеют свой номер, состоящий из римской и арабской цифр.

Обычно родословная составляется по одному признаку или одному заболеванию. Родословная должна иметь легенду, т.е. пояснение или анамнез. При составлении родословных используют стандартные обозначения (рис. 2).



Рис. 2. Система символов родословной по Г. Юсту

Медико-генеалогический метод позволяет установить:

- 1) наследственный характер признака;
- 2) тип наследования;
- 3) зиготность лиц в родословной;
- 4) пенетрантность гена,
- 5) вероятность рождения ребенка с данной наследственной патологией.

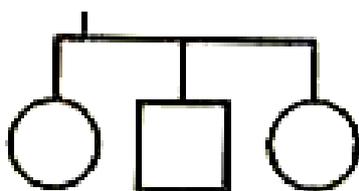
Этапы анализа генеалогического древа:

- 1) сбор данных о наличии анализируемого признака у кровных родственников обследуемого в трех и более поколениях (анамнез, легенда);
- 2) построение родословного древа с использованием символики;
- 3) анализ;
- 4) заключение.

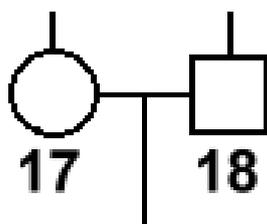
Методика составления родословных

1. Родословное древо начинают составлять с пробанда. Символ пробанда, в зависимости от пола (квадратик или кружок), обозначается стрелкой. От пробанда начинают располагать остальных членов родословной.

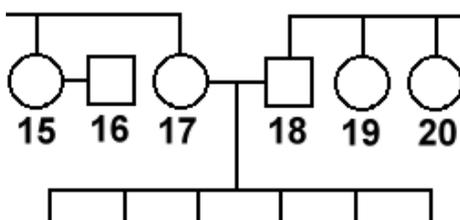
2. Сначала размещают символы родных братьев и сестер пробанда в порядке их рождения, слева направо, соединяя «графическим коромыслом»:



3. Затем выше линии пробанда указывают родителей, соединяя их графическим обозначением знака брака, проводят линию, соединяющую с «коромыслом» пробанда:



4. В ряду поколения родителей располагают символы их братьев и сестер с супругами, родственников супругов в соответствии со степенью родства:



5. Выше родителей изображаются поколения бабушек и дедушек, их братьев и сестер;

6. Ниже линии пробанда указываются, если есть, его дети и племянники, соединенные соответствующим образом с линией их родителей;

7. Если в семье несколько не связанных между собой наследственных заболеваний, то составляют родословные для каждой патологии отдельно;

8. После составления родословного древа начинают генеалогический анализ.

Анализ родословной включает:

- определение типа наследования признака (аутосомно-доминантное, аутосомно-рецессивное, сцепленное с X-хромосомой доминантное, сцепленное с X-хромосомой рецессивное, голандрическое);
- по возможности указывают генотипы всех членов родословной;
- выявляют наличие взаимодействия аллелей генов;
- определяют вероятность рождения ребенка с исследуемой наследственной патологией.

На основании проведенного анализа прогнозируют вероятность проявления патологии у потомства.

Применение генеалогического метода показало, что при кровнородственном браке значительно возрастает вероятность появления в потомстве заболеваний с рецессивным типом наследования, врожденных аномалий, мертворождений. Это определяется тем, что у родственников чаще встречаются рецессивные аллели генов одного наследственного заболевания и в браке носителей этого аллеля вероятность гомозиготного рецессивного генотипа составляет 25%.

Пример: наследование гемофилии в царских домах Европы (рис. 3).

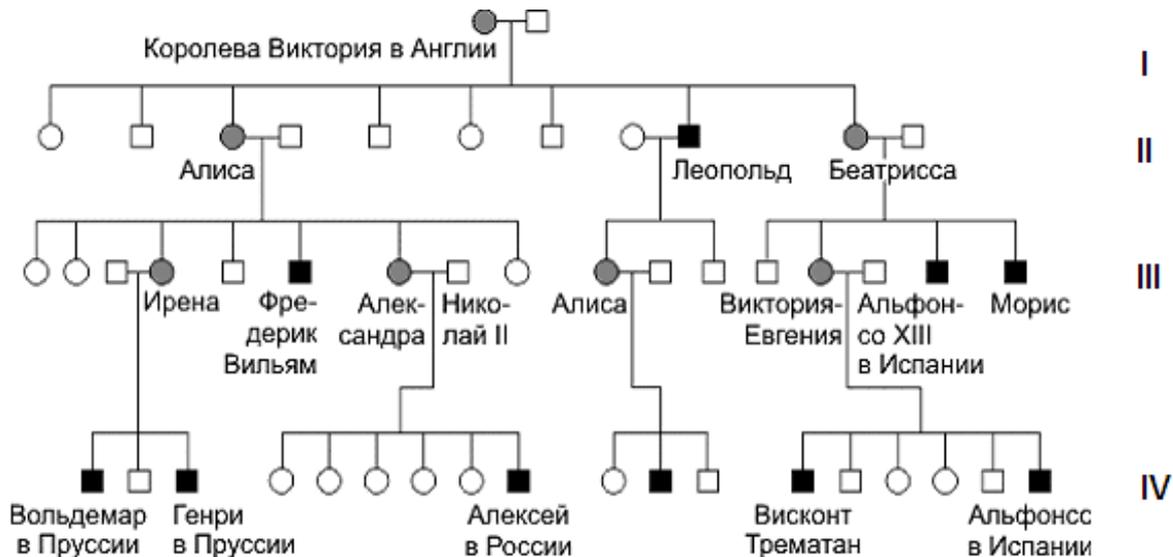


Рис. 3. Наследование гемофилии в царских домах Европы.

Используя генеалогический метод, были определены типы наследования многих признаков у человека.

Аутосомно-доминантный тип наследования признаков у человека:

- 1) заболевание наблюдается в каждом поколении, т.е. прослеживается в родословной по вертикали (кроме случаев новой мутации);
- 2) ген, отвечающий за признак локализуется в аутосомной хромосоме;
- 3) признак встречается в родословной часто, практически во всех поколениях, одинаково часто и у мальчиков, и у девочек;
- 4) если признак есть у одного из родителей, то этот признак проявится либо у всего потомства (при гомозиготном генотипе), либо у половины (при гетерозиготном генотипе);
- 5) аутосомно-доминантный признак, проявляется как в гомозиготном, так и гетерозиготном генотипе (при 100% пенетрантности);
- б) риск рождения больного ребенка, при наличии одного больного родителя (или обоих) с гомозиготным генотипом составляет 100%;

7) риск рождения больного ребенка составляет 75%, если оба родителя больны и имеют гетерозиготный генотип;

8) риск рождения больного ребенка составляет 50%, при наличии одного больного родителя с гетерозиготным генотипом.

По аутосомно-доминантному типу наследуются возможность свертывать язык в трубочку (рис. 4), полидактилия (увеличенное количество пальцев) (рис. 5), брахидактилия (короткопалость, обусловленная отсутствием двух фаланг на пальцах), раннее облысение, сросшиеся пальцы, катаракта (помутнение хрусталика глаз), хрупкость костей, ахондроплазия (карликовость), глаукома (повышение внутриглазного давления), синдром Марфана (недоразвитие соединительной ткани), врожденный вывих бедра, подагра и многие другие.

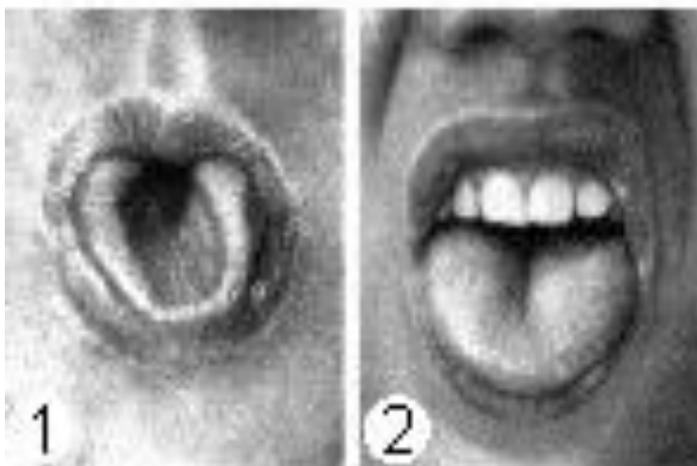


Рис. 4. Доминантный признак - способность свертывать язык в трубочку (1) и рецессивный – отсутствие этой способности (2)



Рис. 5. Наследование полидактилии. Доминантный признак – полидактилия, рецессивный – нормальное количество пальцев.

Пример родословной с аутосомно-доминантным типом наследования (рис. 6):

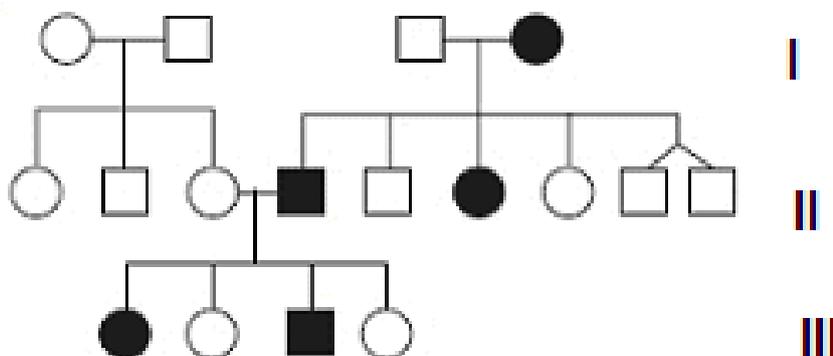


Рис. 6. Аутосомно-доминантный тип наследования катаракты.

Аутосомно-рецессивный тип наследования признаков у человека:

1) признак может проявиться у детей, даже если родители не имеют этого признака;

2) если родители гетерозиготные носители одного и того же мутантного рецессивного аллеля гена, то в потомстве: 50% детей - фенотипически здоровы, но являются носителями мутантной аллели гена; 25% - получают рецессивную аллель от обоих родителей, и будут страдать наследственным заболеванием (гомозиготы); 25% - будут здоровы фенотипически и генотипически;

3) признак встречается редко, не во всех поколениях, одинаково часто и у девочек, и у мальчиков;

4) при аутосомно-рецессивном типе наследования заболевание может прослеживаться через одно или несколько поколений, в родословной наблюдается наследование по горизонтали;

5) в случае кровнородственных браков между родителями пробанда наблюдается увеличение числа больных в родословной.

По аутосомно-рецессивному типу наследуются альбинизм, рыжие волосы, галактоземия (см приложение 1), муковисцидоз, фенилкетонурия (ФКУ), галактоземия, акаталазия, алькаптонурия, болезнь Вильсона (гепато-церебральная дистрофия), цистинурия, болезнь Тея-Сакса, талассемия и другие.

Пример родословной с аутосомно-рецессивным типом наследования (рис. 7):

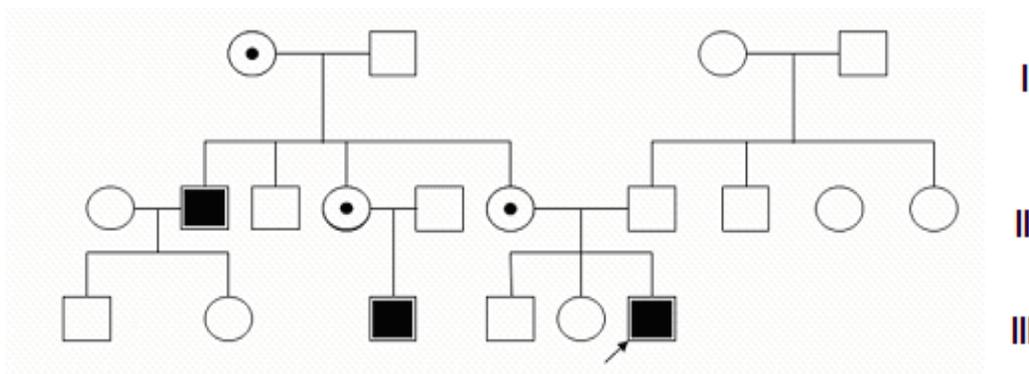


Рис. 7. Аутосомно-рецессивное наследование фенилкетонурии

Наследование, сцепленное с полом

Наследование, сцепленное с полом – это наследование генов, локализованных в половых хромосомах.

X-сцепленный доминантный тип наследования признаков у человека:

1) наследование определено расположением гена в X-половой хромосоме;

- 2) признак в два чаще встречается у лиц женского пола;
- 3) если мать здорова, а отец болен, то у всех дочерей признак будет проявляться, а у сыновей нет;
- 4) если мать больна, а отец здоров, то признак передается потомству независимо от пола (он может проявляться и у девочек, и у мальчиков).

Заболевания, которые наследуются X-доминантно: фосфатдиабет (несахарный диабет), дефект зубной эмали, витамин Д-резистентный рахит.

Пример родословной с X-доминантным типом наследования (рис. 8).

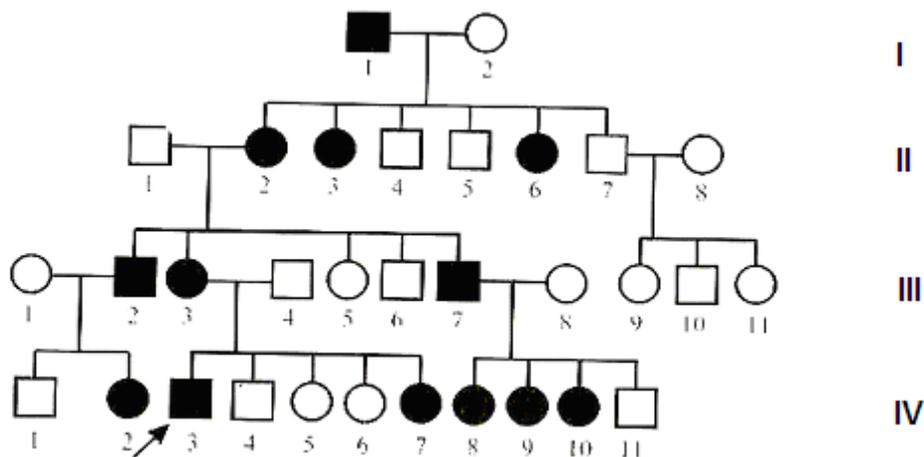


Рис. 8. X-доминантное наследование витамин Д-резистентного рахита

X-сцепленный рецессивный тип наследования признаков у человека:

- 1) наследование определено расположением гена в X-половой хромосоме признак чаще встречается у лиц мужского пола;
- 2) чаще признак проявляется через поколение;
- 3) если оба родителя здоровы, но мать гетерозиготна, то признак проявляется у 50% сыновей;
- 4) если отец болен, а мать гетерозиготна, то обладателями признака могут быть лица мужского и женского пола с вероятностью 25%.

По X-сцепленному рецессивному типу наследуются: гемофилия, дальтонизм, дефицит глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (фермента метаболизирующего многие лекарства), мышечная дистрофия Дюшена, ихтиоз («рыбья» кожа) и другие.

Пример родословной с X-сцепленным рецессивным типом наследования (рис. 9).

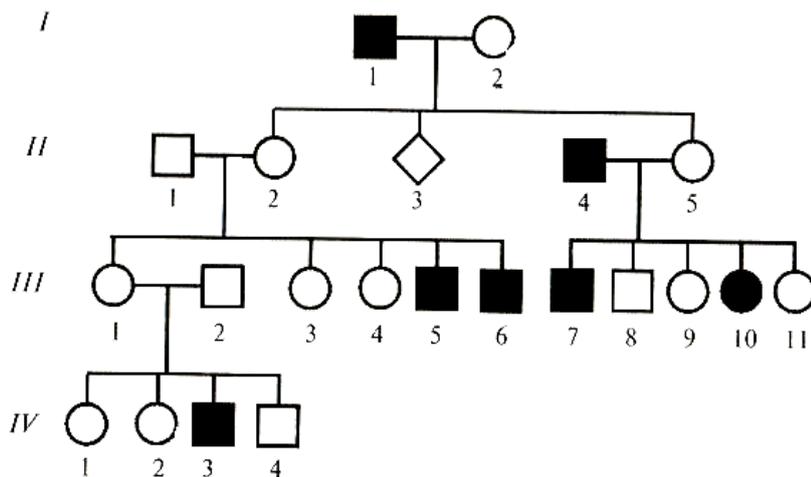


Рис. 9. X - сцепленное рецессивное наследование дальтонизма

Y-сцепленный (голандрический) тип наследования признаков

у человека:

- 1) обусловлен локализацией гена в Y - половой хромосоме;
- 2) признак встречается исключительно у лиц мужского пола;
- 3) отец передает признак всем сыновьям.

В настоящее время идентифицировано около ста генов, локализованных в Y – половой хромосоме. Большинство из них определяют развитие организма по мужскому типу.

В Y хромосоме находятся гены, детерминирующие развитие семенников, отвечающие за сперматогенез, контролирующие интенсивность роста конечностей и формирование зубов, определяющие характер оволосения.

Мутации некоторых из этих генов приводят к развитию рака яичек, простаты, повышенной волосатости края ушной раковины (рис. 10), перепончатой складки между пальцами.

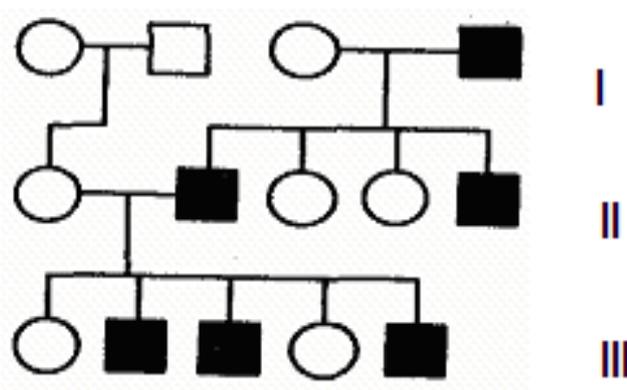
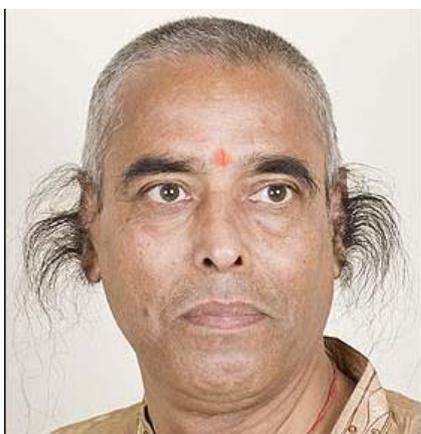


Рис. 10. Родословная Y-сцепленного наследования гипертрихоза края ушной раковины

Цитоплазматическое наследование

Цитоплазматическое наследование – это наследование локализованных в ДНК митохондрий генов. Митохондрии передаются в зиготу с цитоплазмой яйцеклеток (в каждой яйцеклетке – 25 000 митохондрий, содержащих от 2 до 4 кольцевых ДНК хромосом).

Для цитоплазматического наследования характерно:

- 1) признак передается потомкам только от матери;
- 2) мать, несущая признак, передает его всему потомству (реже только части потомства);
- 3) признак одинаково часто встречается у представителей обоих полов.

Генные мутации в митохондриальной ДНК обнаружены при атрофии зрительного нерва Лебера, митохондриальных миопатиях, доброкачественной опухоли (онкоцитоме), при прогрессирующих офтальмоплегиях (нарушениях зрения).

Пенетрантность и экспрессивность

Понятие *пенетрантность* отражает частоту фенотипического проявления генотипа в популяции. Пенетрантность выражается в процентах особей, у которых анализируемый генотип фенотипически проявляется.

$$П = (ПВ : ТВ) \times 100\%,$$

где П – пенетрантность, ПВ – практическая вероятность, ТВ – теоретическая вероятность.

Пенетрантность может быть полной (100%) и неполной (<100%).

Низкая пенетрантность обусловлена тем, что в процессе онтогенеза не все гены реализуются в признак. На некоторые из них оказывают влияние другие аллели генов. У человека часто встречаются гены, реализация которых в признак, обуславливается взаимодействием аллелей одного или нескольких генов. Например, при: кодоминировании, неполном доминировании, комплементарности, эпистазе, полимерии.

При анализе родословной и определении генетического прогноза потомства необходимо учитывать значение пенетрантности признака. Например: арахнодактилия (укорочение пальцев, рис. 11) наследуется как доминантный аутосомный признак с пенетрантностью 30%; праворукость – аутосомно-доминантный признак с полной (100%) пенетрантностью.

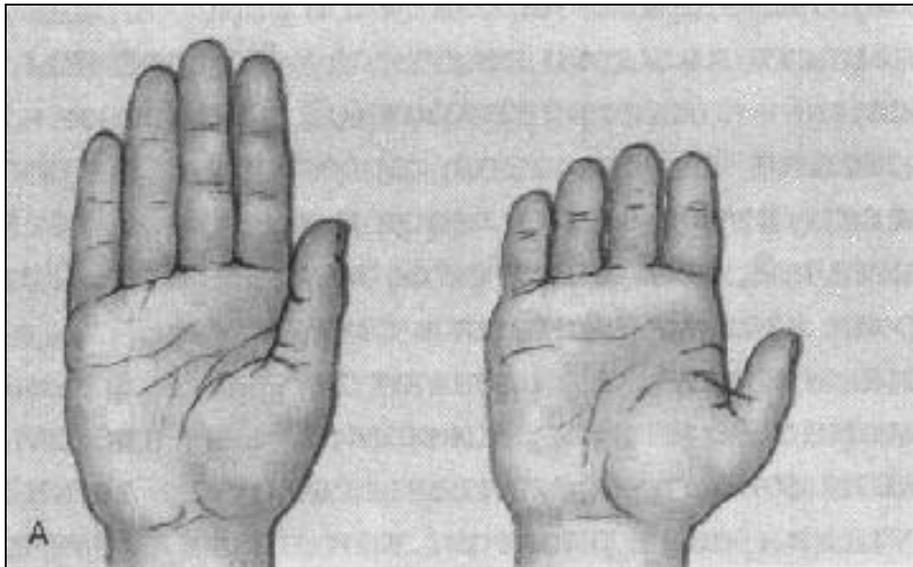


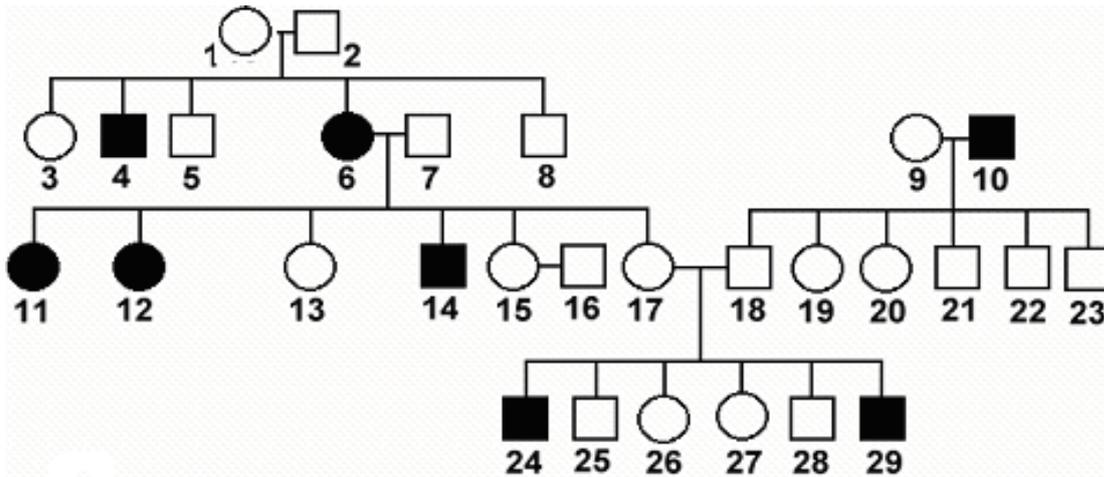
Рис. 11. Арахнодактилия

Экспрессивность – степень выраженности признака в фенотипе. Например, арахнодактилия может проявиться даже у членов одной семьи в разной степени тяжести.

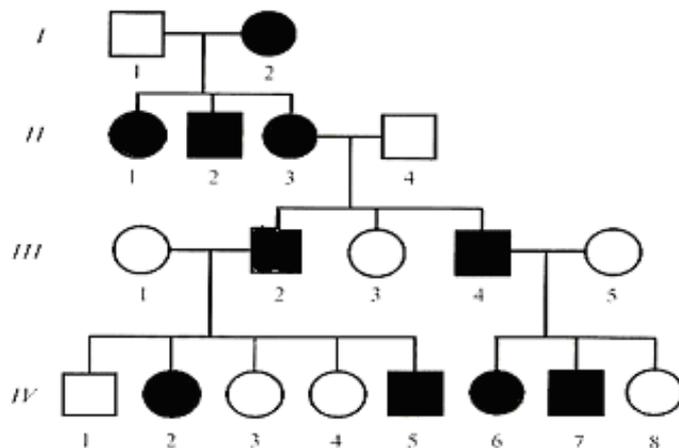
Самостоятельная работа

Проанализируйте родословные, представленные ниже, и определите тип наследования патологического признака.

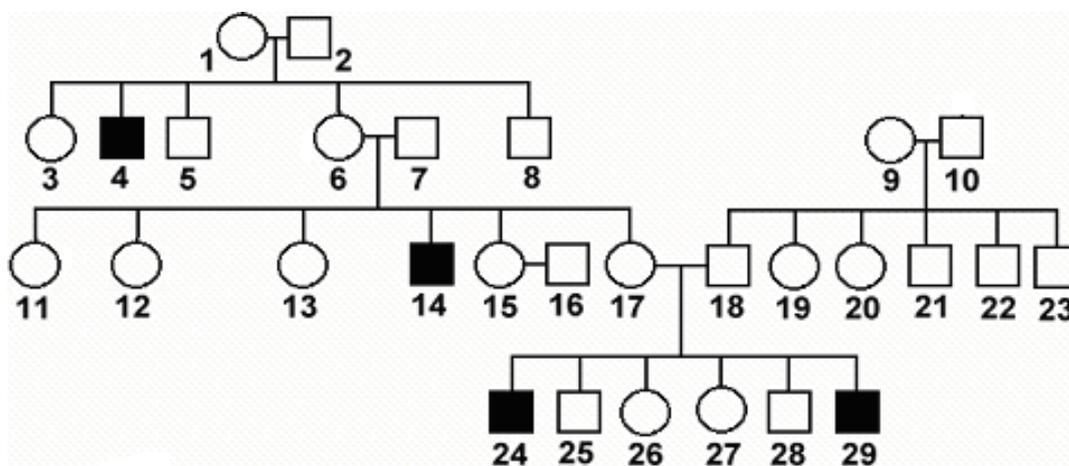
Задание № 1.



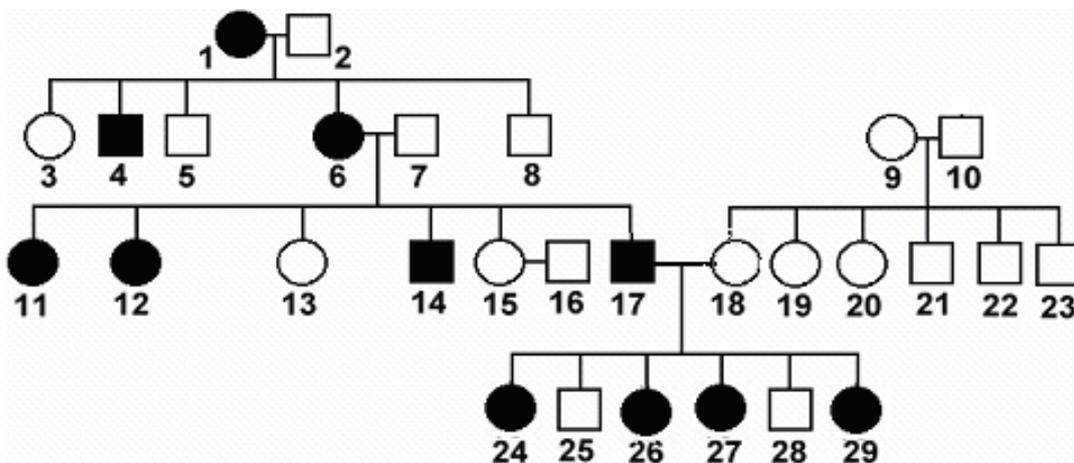
Задание № 2.



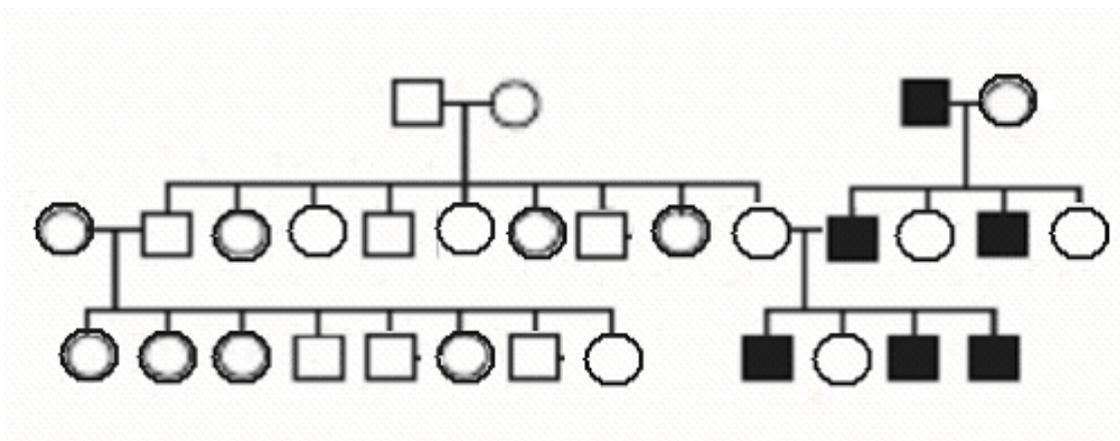
Задание № 3.



Задание № 4.



Задание № 5.



Ответы на задания

- Задание № 1** ауtosомно-рецессивный тип наследования
Задание № 2 ауtosомно доминантный тип наследования
Задание № 3 X- сцепленный рецессивный тип наследования.
Задание № 4 X- сцепленный доминантный тип наследования.
Задание № 5 Y- сцепленный тип наследования

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Цитогенетический метод основан на изучении числа и структуры хромосом в клетках человека. Начал применяться с 1956 г., когда Д. Тио и Л. Леван микроскопически установили, что в клетках человека находится 46 хромосом.

Метод включает кариотипирование и определение X- и Y-полового хроматина. Он позволяет изучать нормальную морфологию хромосом и кариотипа в целом, определять генетический пол организма, диагностировать хромосомные болезни, связанные с изменением числа хромосом или с нарушением целостности хромосом.

Метод кариотипирования включает три основных этапа:

- 1) культивирование клеток;
- 2) окраска;
- 3) микроскопический анализ.

Материалом для кариотипирования чаще всего являются лимфоциты периферической крови. Кровь берется у взрослых из вены, у новорожденных — из пальца, мочки уха или пятки. Лимфоциты культивируются в особой питательной среде, в состав которой, добавляю́т фитогемагглютинин (ФГА), стимулирующий митотическое деление лимфоцитов. Через 72 часа в культуру клеток добавляю́т колхицин. Колхицин способен разрушать митотическое веретено деления, останавливая митоз на уровне метафазы. Именно во время метафазы хромосомы являются наиболее конденсированными. Далее клетки переносят на предметные стекла, сушат, фиксируют и окрашивают различными красителями.

Окраска может быть сплошной (рутинной), когда хромосомы окрашиваются равномерно по всей длине. Окраска позволяет выявить геномные мутации, определить групповую принадлежность хромосом.

Для систематизации хромосом используют две стандартные классификации: Международную Денверскую (1960 г.) и Парижскую (1971 г.) номенклатуры.

В соответствии с Международной Денверской классификацией хромосомы человека систематизированы в 7 групп, обозначаемых буквами английского алфавита: A, B, C, D, E, F, G на основании их размеров, морфологии и центромерного индекса (табл. 1, рис. 12).

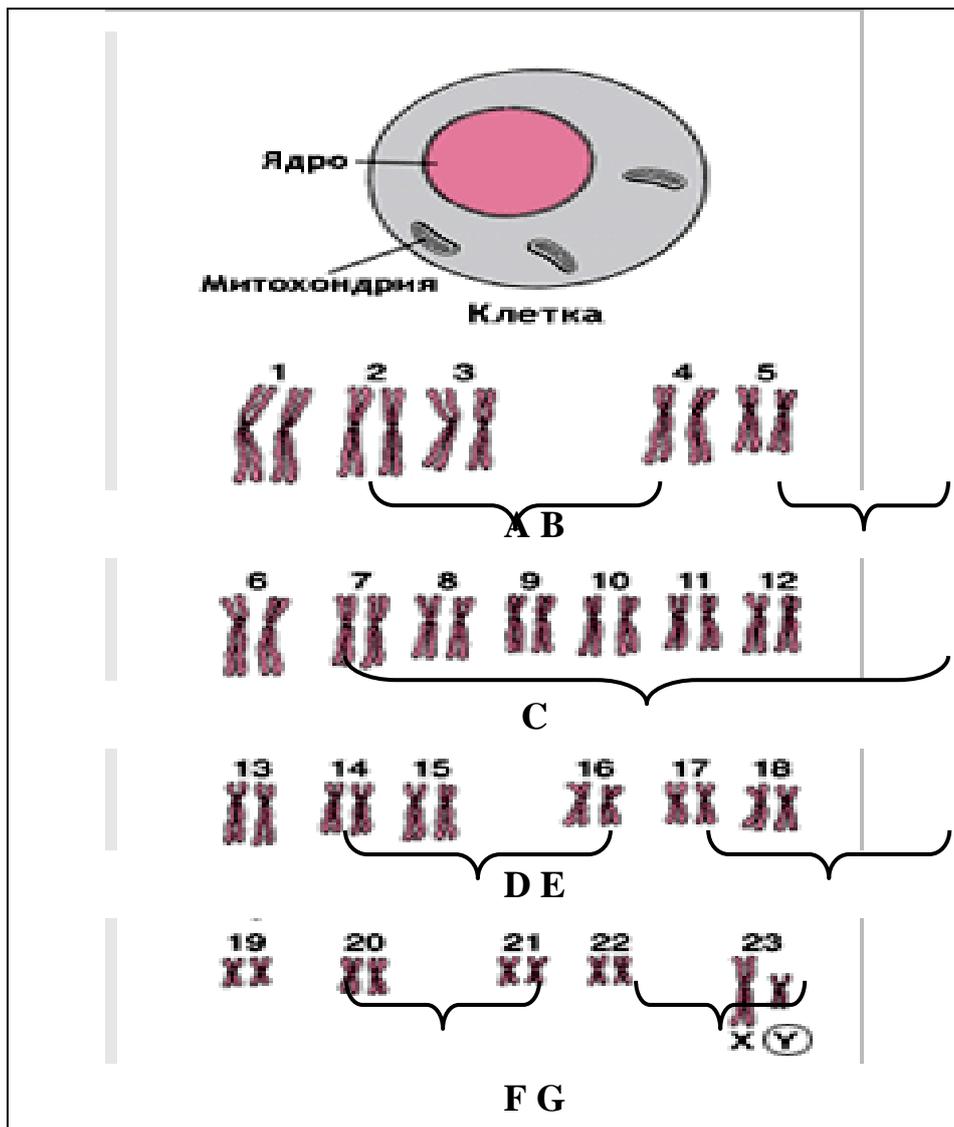


Рис. 12. Хромосомы человека

Таблица 1

Денверская классификация хромосом человека

№	Клас-сифи-кация	Пары хромосом	Форма хромосом	Центромер-ный индекс
1	А	1 - 3	Самые крупные, Метацентрические	0,40-0,49
2	В	4 - 5	Крупные, Субметацентрические	0,24-0,30
3	С	6-12 и X - половая хромосома	Средние метацентрические и субмета- центрические	0,28-0,43

4	D	13 - 15	Средние акроцентрические, наличие спутников на коротких плечах	до 0,15
5	E	16-18	Небольшие метацентрические и субметацентрические	0,26-0,40
6	F	19 - 20	Малые метацентрические	0,36-0,46
7	G	21 – 22 и Y - хромосома	Малые метацентрические. Наличие спутников на коротких плечах	0,13-0,33

В настоящее время для идентификации хромосом, в соответствии с парижской номенклатурой, используется дифференциальное окрашивание, выявляющее характерный индивидуальный рисунок на хромосомах. Рисунок представляет собой полосы поперечной исчерченности разного цвета, благодаря которым можно более точно выявить хромосомные aberrации.

Впервые метод дифференцированного окрашивания хромосом был разработан в 1969 г. Т. Касперсоном (рис. 13).

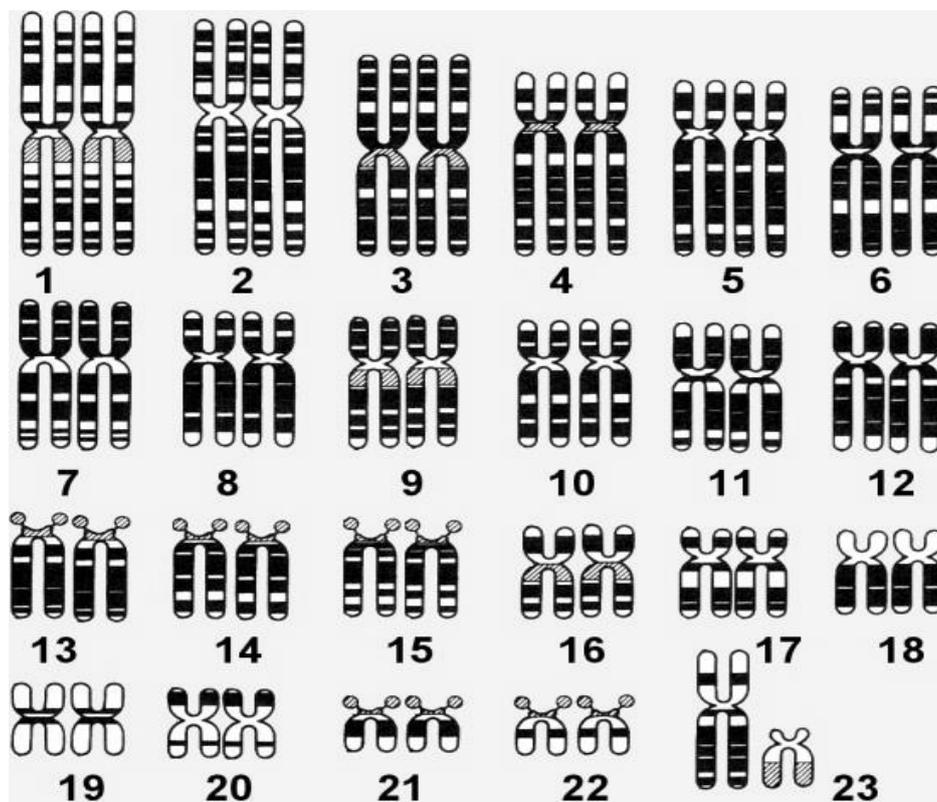


Рис. 13. Дифференцированное окрашивание хромосом

Дифференциальная окраска используется для выявления структурной перестройки хромосом (хромосомные мутации). Расположение и длина темных и светлых полос строго индивидуальна для каждой хромосомы, благодаря этому можно провести более точную идентификацию гомологичных пар и выявить перестройки хромосом.

Наиболее эффективен **G-метод** дифференциального окрашивания, для которого используют краситель Гимзы. При этом окрашивании темные полосы на хромосомах появляются в области гетерохроматина, а светлые – в участках эухроматина. При таком окрашивании количество полос на хромосомах в метафазных пластинках достигает 400. **R-окраска** - противоположная G-окраске. **Q-окраска** – такая же как G, но используются красители содержащие флюорохромы, в результате под микроскопом виден светящийся гетерохроматин. **C – окраска** - прокрашивает только конститутивный гетерохроматин в основном в области центромер.

Для дифференциальной окраски используют также **FISH-метод**, при которой хромосомы окрашиваются в разные цвета.

Использование цитогенетического метода позволило выявить группу болезней, связанных с изменением числа и структуры хромосом. Такие болезни получили название хромосомных.

Для описания кариотипа человека используется универсальная схема и специальные символы. Например, запись 46,XX – обозначает нормальный кариотип женщины, а 46,XY – нормальный кариотип мужчины (рис. 14).

Для выявления аномалий кариотипа плода используют различные клеточные культуры. Их выбор определяется сроком беременности: до 12 недель – используют клетки ворсин хориона, а в более поздние сроки – клетки плода, выделенные из амниотической жидкости, пуповинной крови и плаценты.

Согласно рекомендаций IV Международного конгресса по генетике человека (Париж, 1971 г.), при описании геномных мутаций, номер добавочных хромосом помещают после общего числа аутосом и половых хромосом со знаком «плюс» или «минус». Например, запись 47,XX+21 обозначает кариотип с трисомией по 21 паре хромосом у женщины. Кариотип мужчины с двумя X-хромосомами изображают как 47,XXY.

Примеры:

Кариотип	Тип мутации
47,XX+13	Синдром Патау
47,XY+18	Синдром Эдвардса
47, XX+21	Синдром Дауна

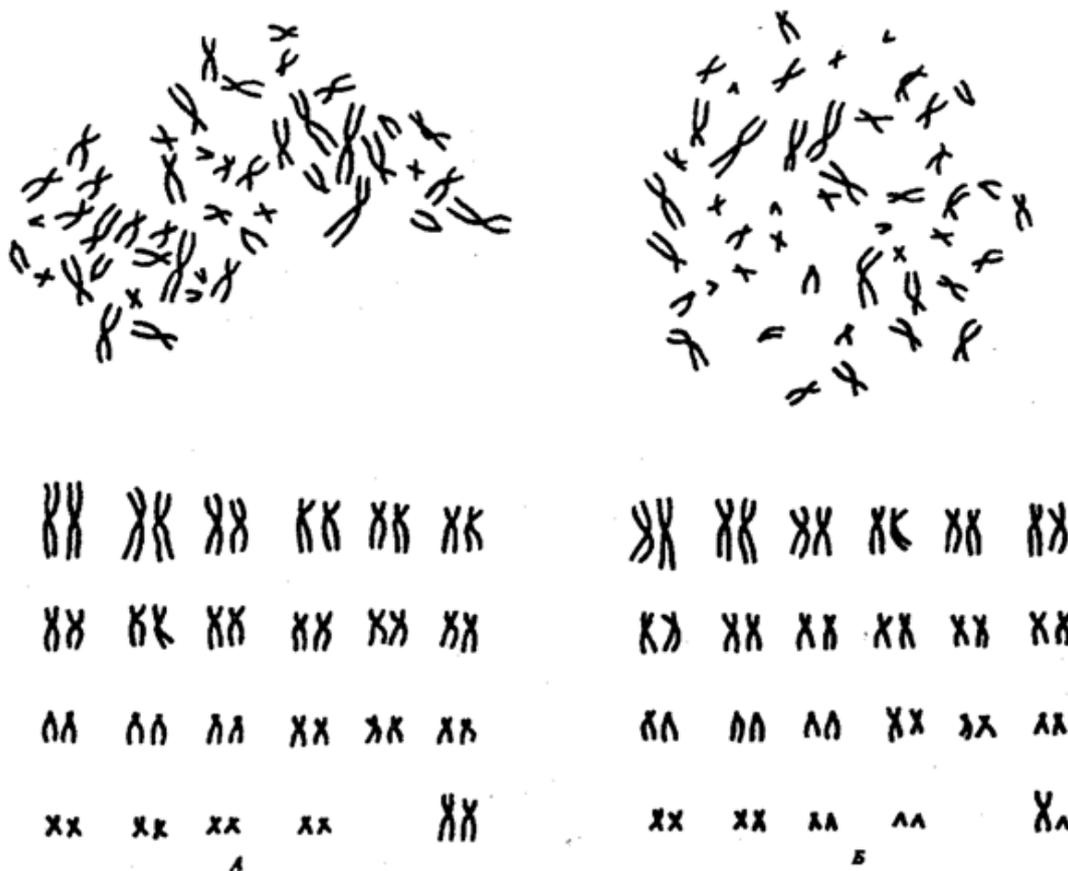


Рис. 14. Нормальный кариотип женщины (слева), и мужчины (справа)

При описании хромосомных мутаций знак «плюс» или «минус» ставят после номера хромосомы, чтобы указать удлинение или укорочение ее плеча. Буква q символизирует длинное плечо, а p – короткое (табл. 2).

Таблица 2

Обозначение мутаций кариотипа человека

Символическая запись	Тип мутации	Синдром
46,XY,1q+	dup (дупликация) длинного плеча хромосомы 1	не жизнеспособен
46,XY,15t ²¹⁺	t (транслокация)	Дауна
46,XY,5p-	del (делеция) короткого плеча хромосомы 5	«кошачьего крика»

Сокращения – dup (дупликация), del (делеция), inv (инверсия), r (кольцевидная хромосома) и t (транслокация) – обозначают хромосомные aberrации. Номера хромосомы помещают после сокращений в скобках. Например, запись 46,XX,r(18) обозначает, что кариотип женщины с 46 хромосомами, включает r-

хромосому 18. Например, запись 46,XY,1q+ указывает на увеличение длинного плеча хромосомы 1 мужчины. Формула 47,XY+14p+ указывает на кариотип мужчины с 47 хромосомами, включая и дополнительную хромосому 14 и удлинение ее короткого плеча.

Чаще при изучении хромосом обнаруживают полиморфизм, который характерен для акроцентрических хромосом и, как правило, отражает вариабельность коротких плеч, размеров гетерохроматиновых сегментов, наличие спутников и их величину.

Примеры:

1 **46,XX,9qh+** Увеличение размера гетерохроматинового участка в длинном плече хромосомы 9 женщины (h – heterochromatine)

2 **46,XY,Yqh-** Уменьшение размера гетерохроматинового района на длинном плече Y хромосомы у мужчины

3 **46,XX,15pss** Появление двойных спутников на коротком плече хромосомы 15 у женщины (s – sputnic)

4 **46,XX,21ps+** Увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 21 у женщины.

Установлено, что среди супружеских пар, у которых наблюдалось рождение детей с пороками развития, а также страдающих бесплодием и привычным невынашиванием беременности, чаще обнаруживается носительство хромосом с крупными гетерохроматиновыми блоками. Преобладание лиц с увеличенными гетерохроматиновыми сегментами в акроцентрических хромосомах, а также в хромосомах 1, 9 и 16 наблюдается у детей с врожденными пороками развития.

Метод определения полового хроматина

М. Барр и Ч. Бертрам (1949 г.), изучая нейроны кошки, обратили внимание на то, что в интерфазном ядре клеток содержится интенсивно окрашиваемое тельце, причем оно присутствует только в ядрах клеток самок и отсутствует у самцов. Замечено было, что между числом телец полового хроматина и числом X-половых хромосом имеется прямая связь. Это тельце получило название полового хроматина, или *тельце Барра*.

У ряда позвоночных и у человека оно появляется в раннем онтогенезе на стадии гастрюлы, но раньше развития половых желез. Половой хроматин в интерфазных ядрах обусловлен спирализацией одной из X-половых хромосом.

На локализацию, форму и структуру полового хроматина не влияют половые гормоны, следовательно, он не является вторичным половым признаком.

Несколько исследователей одновременно высказали предположение, что одна из X-хромосом у нормальных женщин относительно не активна в генетическом отношении. В 1961 году английская исследовательница М. Лайон выдвинула гипотезу о механизмах инактивации одной из X-половых хромосом у женщин.

Основные положения этой гипотезы следующие:

1. Одна из двух X-хромосом клеток женщины неактивна. Неактивная хромосома может быть отцовского или материнского организма.

2. Инактивация является механизмом, выравнивающим баланс генов половых хромосом в клетках мужчин и женщин.

3. Инактивация происходит в раннем эмбриогенезе и сохраняется во время дальнейшего размножения и развития клеточной линии.

Если у женщин в ядре клетки несколько X-половых хромосом, то и несколько телец Барра, активной остается лишь одна X-хромосома. X-хромосома не вся инактивируется, часть короткого плеча остается генетически активной. При увеличении количества X-хромосом в кариотипе организма образуются тельца Барра в количестве на единицу меньше числа X-хромосом.

По наличию лишнего или отсутствию тельца Барра можно диагностировать некоторые виды наследственных заболеваний (табл. 3).

Таблица 3

Количество телец Барра при геномных мутациях

Кариотип	Синдром	Количество телец Барра
45,X0	Шерешевского – Тернера	0
47,XXY	Клайнфельтера	1
47,XYY	Джейкобса	0
47,XXX	трисомии X	2
48,XXXX	тетрасомии X	3

Клетки не содержащие половой хроматин (хроматин-отрицательные клетки) обнаруживаются у здоровых мужчин и у женщин, имеющих набор хромосом 45, X0.

Например, у мужчины с кариотипом 47,XXY обнаруживается одно тельце Барра (рис. 15), у кариотипа 48,XXXY - два тельца Барра. Три тельца Барра встречается при тяжелом синдроме Клайнфельтера с кариотипом 49,XXXXY.

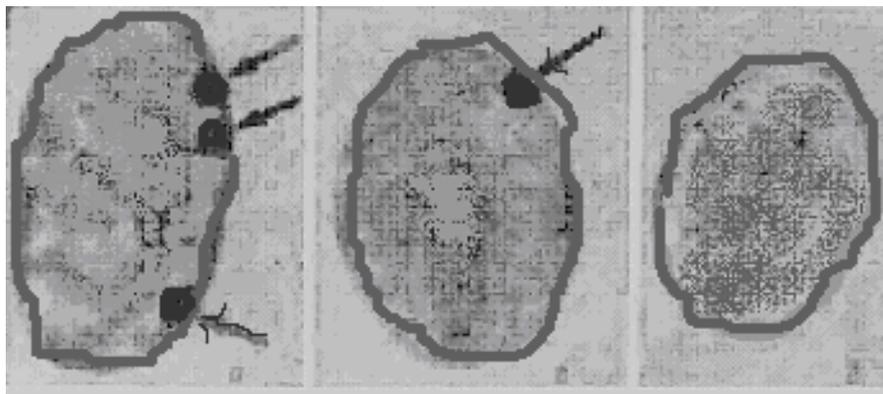


Рис. 15. Тельце Бара

Часто в ядрах клеток нормального мужского организма встречается несколько псевдотелец Барра (конденсированных участков аутосом) и спирализованных Y-хромосом, имеющих меньшие размеры. Поэтому, при диагностике различных хромосомных заболеваний необходимо уметь отличать эти образования от истинного X-полового хроматина.

Хромосомные болезни

Синдромы, обусловленные хромосомными aberrациями, исключительно разнообразны, но каждый из них встречается сравнительно редко (1 случай на десятки тысяч новорожденных). Геномные мутации, обусловленные изменением числа хромосом менее разнообразны, но встречаются чаще.

Нарушения числа или структуры хромосом возникают в время гаметогенеза у родителей. Чаще хромосомные болезни являются результатом мутаций, произошедших в половых клетках одного из родителей. В большинстве случаев хромосомные болезни не наследуются.

Синдром Дауна

Это одна из самых часто встречающихся хромосомных болезней. Дети с синдромом Дауна рождаются с достаточно высокой частотой – 1 на 750 новорожденных.

Болезнь легко диагностируется, так как имеет ряд характерных признаков: маленький череп, плоское и широкое переносье, узкие глазные щели с косым разрезом, наличие складки верхнего века, укороченные конечности, пси-

хическая отсталость. Часто наблюдаются врожденные пороки развития внутренних органов.

Развивается при мутации - трисомия 21 хромосомы (рис. 16). В 80% случаев непосредственной причиной является нерасхождение хромосом в I-ом делении мейоза.

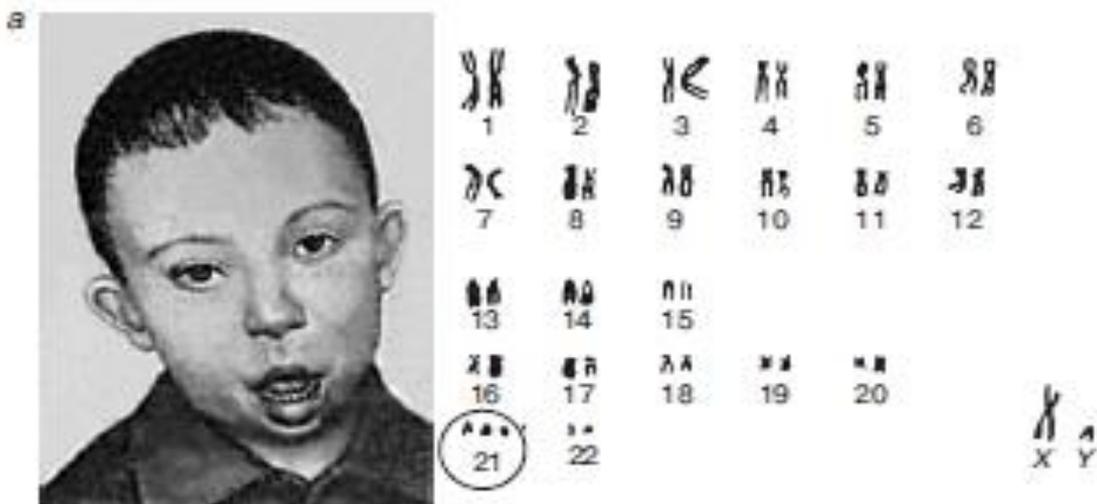


Рис. 16. Синдром Дауна

Главным морфологическим признаком болезни Дауна можно считать деформации лица, физиологическим - умственную отсталость, проявляющуюся в широком диапазоне: от полной идиотии до сравнительно легких степеней дебилности.

При синдроме Дауна описаны пороки сердца и крупных сосудов, пороки органов пищеварительного тракта, черты преждевременного старения, снижение продолжительности жизни в 5-10 раз, отклонения в дерматоглифике, иммунодефицитные состояния, нарушения репарации молекулярных повреждений ДНК.

Чаще дети с синдромом Дауна рождаются у матерей в возрасте старше 35 лет.

Синдром Клайнфельтера

Обусловлен увеличением числа X-половых хромосом у мужчины (рис. 17, 18).

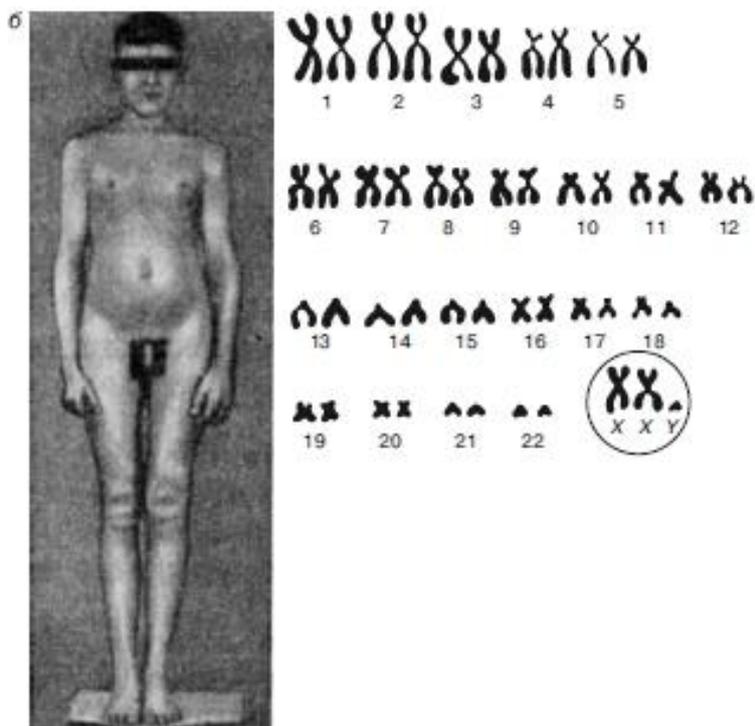


Рис. 17. Синдром Клайнфельтера (47,XXY)

Они характеризуются недоразвитием мужских половых органов, дегенерацией семенных канальцев, часто умственной отсталостью, высоким ростом (за счет непропорционально длинных ног), гинекомастией (рис. 18).



Рис. 18. Гинекомастия у мужчины с синдромом Клайнфельтера

Синдром Шерешевского-Тернера

Синдром 45,X0 проявляется у женщин в виде замедления полового созревания, недоразвития половых желез, аменореи (отсутствии менструаций), бесплодия. Женщины с синдромом Шерешевского-Тернера имеют малый рост, диспропорциональное тело: более развитая верхняя часть тела, укороченные

нижние конечности, плечи широкие и узкий таз, короткая шея с крыловидной складкой и ряд других признаков (рис. 19).

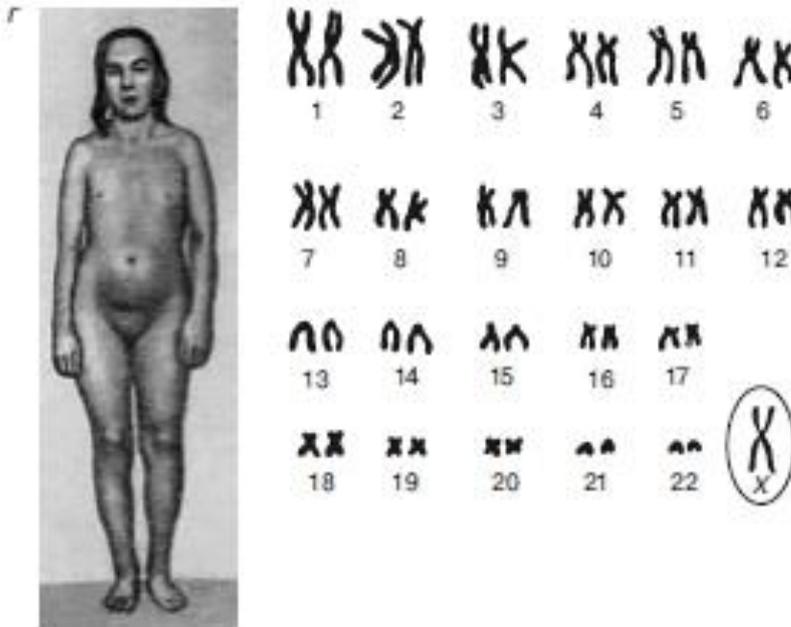


Рис. 19. Синдром Тернера-Шерешевского

Синдром трисомии X

Трисомия X – геномная мутация, обусловленная лишней X – половой хромосомой, проявляется у женщин параклинически (рис. 20).

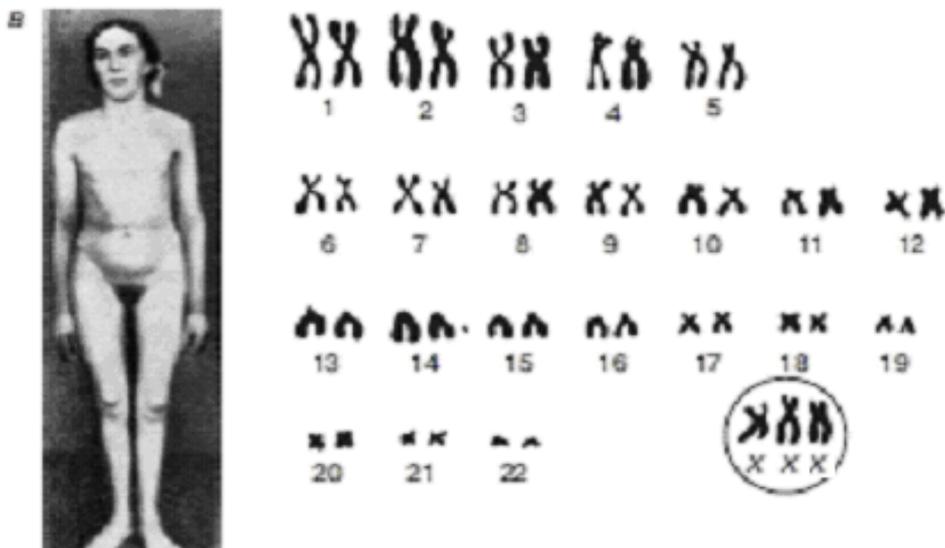


Рис. 20. Синдром трисомии X

Синдром характеризуется недоразвитием половых желез, бесплодием, часто умственной отсталостью, высоким ростом (за счет непропорционально длинных ног), тело диспропорционально.

При тетрасомии X (48,XXXX) наблюдаются выраженные нарушения.

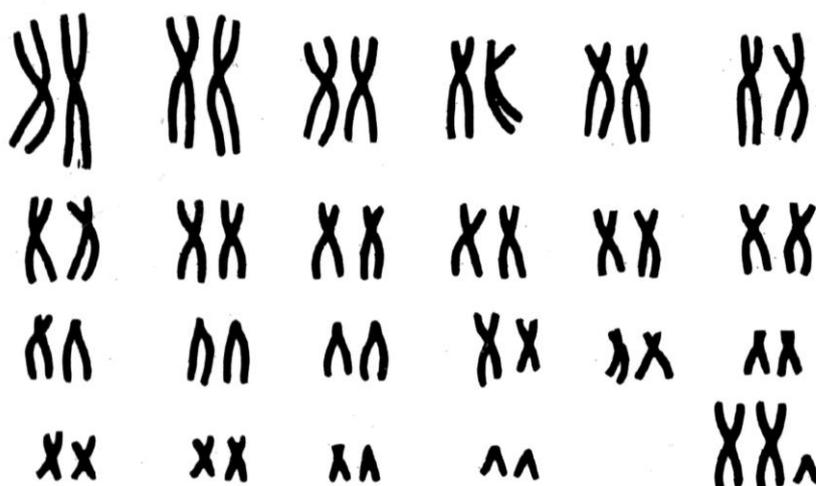
Синдром «кошачьего крика»

Хромосомные болезни возникают и в результате изменения структуры хромосом. Так, делеция р-плеча 5 пары аутосом приводит к развитию синдрома «кошачьего крика». Частота встречаемости: 1 на 50 000 новорожденных. У детей нарушается строение гортани, и они в раннем детстве имеют своеобразный «мяукающий» тембр голоса. Наблюдается отставание психомоторного развития и слабоумие. Сопутствующие признаки: лунообразное лицо, «антимонголоидный» разрез глаз, микроцефалия, синдактилия, врожденные пороки сердца.

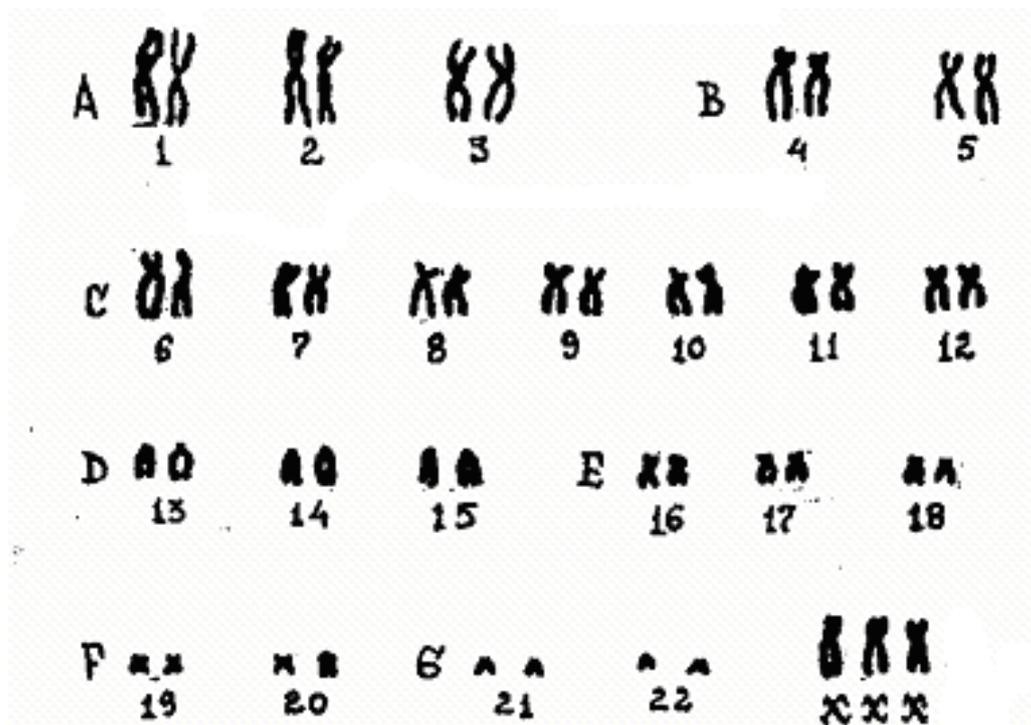
Самостоятельная работа

Определите нарушение кариотипа (синдром) на представленных ниже кариограммах.

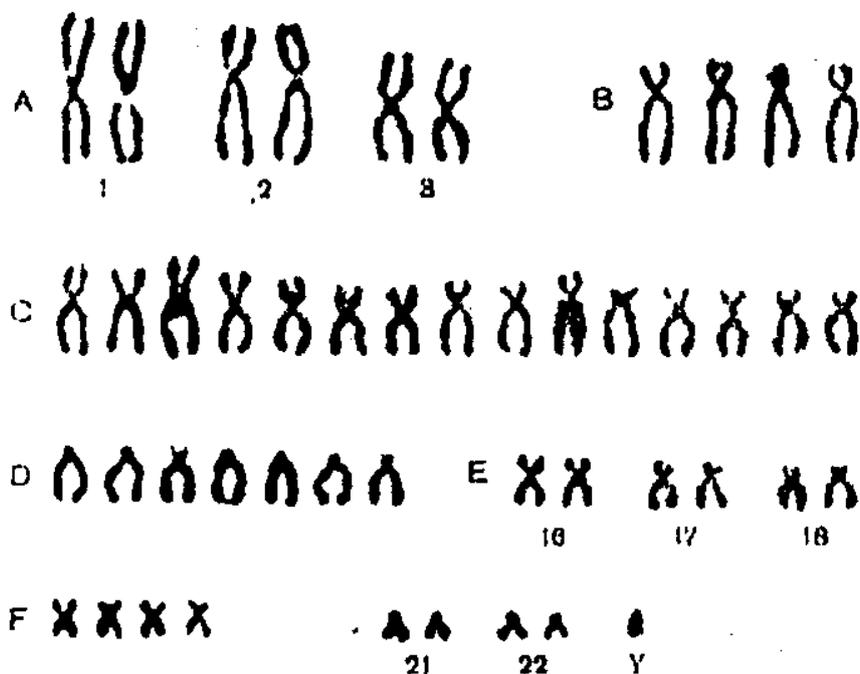
Задание № 1.



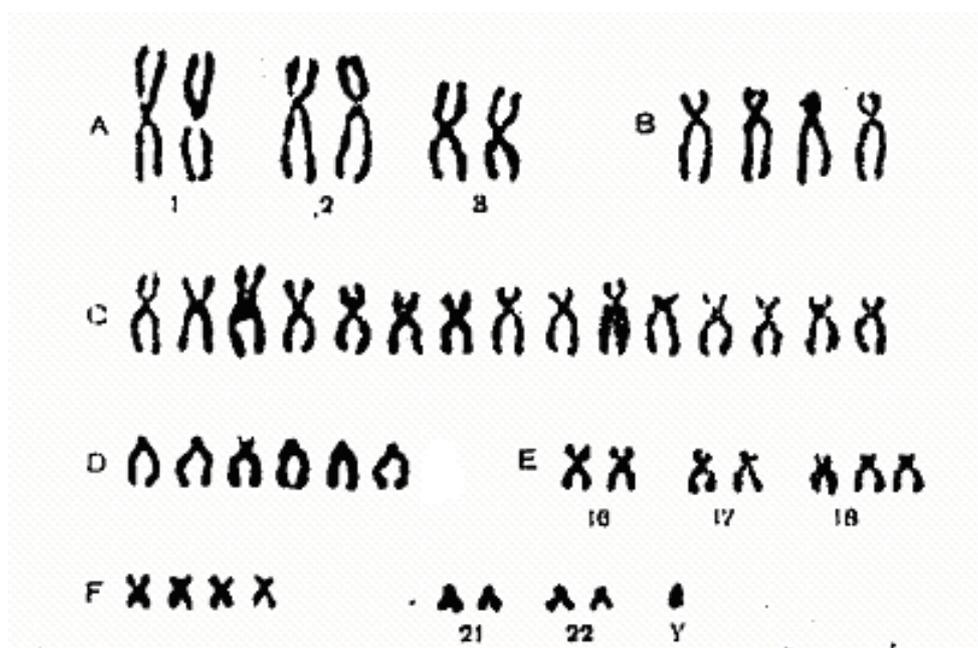
Задание № 2.



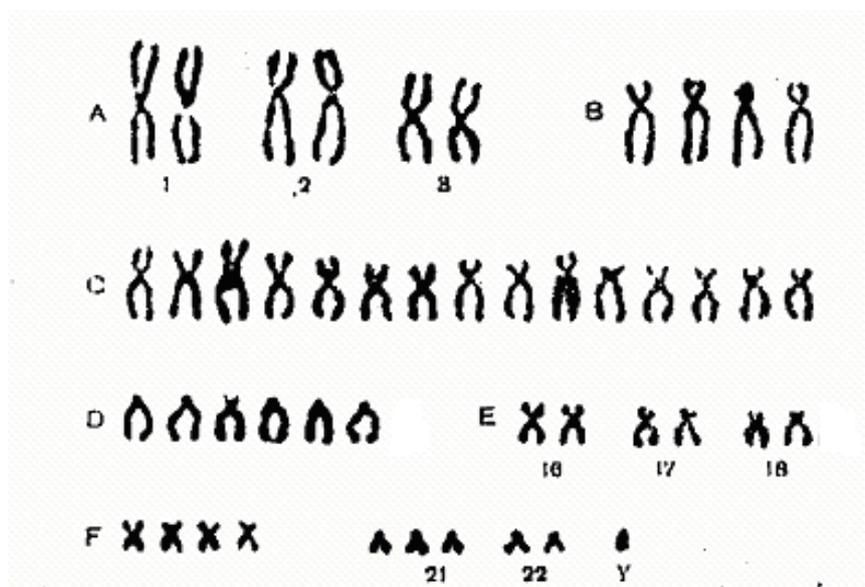
Задание № 3.



Задание № 4.



Задание № 5.



Ответы на задания

- | | |
|-------------|-----------------------|
| Задание № 1 | синдром Клайнфельтера |
| Задание № 2 | синдром трисомии X |
| Задание № 3 | синдром Патау |
| Задание № 4 | синдром Эдвардса |
| Задание № 5 | синдром Дауна |

МЕТОДЫ ГЕНЕТИКИ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Методы генетики соматических клеток в значительной мере компенсируют невозможность применения к человеку метода гибридологического анализа. Благодаря разработке методов генетики соматических клеток человек оказался включенным в группу объектов экспериментальной генетики.

Существуют следующие методы генетики соматических клеток человека:

- простое культивирование – использование культуры клеток различных тканей и органов для изучения наследственности и изменчивости соматических клеток;

- клонирование – получение потомков одной клетки, например гибридом. Гибридома – это клеточный гибрид, полученный путем слияния нормального лимфоцита и опухолевой клетки, способный производить моноклональные антитела одного типа;

- селекция – отбор клеток с заранее заданными свойствами;

- гибридизация. Для гибридизации могут использоваться клетки от разных людей, а также от человека и других животных (мыши, крысы, морской свинки и др.). Гибридные клетки при делении обычно «теряют» хромосомы одного из видов. Например, в гибридных клетках «человек-мышь» постепенно утрачиваются все хромосомы человека, а в клетках «человек-крыса» - сохраняются все хромосомы человека и одна хромосома крысы. Таким образом, можно получать клетки с желаемым набором хромосом, что дает возможность изучать сцепление генов и их локализацию, изучать механизмы первичного действия и взаимодействия генов, регуляцию генной активности.

Методы *генетики соматических клеток* основаны на том, что соматические клетки быстро размножаются на питательной среде, они успешно клонируются, могут сливаться и образовывать гибридные клоны, давая идентичное потомство.

Соматические клетки подвергаются селекционному отбору на питательных средах и могут долго сохраняться при глубоком замораживании.

Методы генетики соматических клеток дают возможность судить о генетической гетерогенности наследственных болезней, изучать их патогенез на молекулярном и клеточном уровнях.

Для этих методов используют культуры соматических клеток, полученных из биопсийного материала (кожа, опухолевая ткань, ткань эмбрионов, клетки из околоплодной жидкости) для генетических исследований человека. Эти методы применяют для пренатальной диагностики патологии плода.

БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД

Метод предложен Ф. Гальтоном (1875 г.) первоначально для оценки роли наследственности и среды в развитии психических признаков человека. В настоящее время близнецовый метод широко применяется в изучении наследственности и изменчивости человека для определения соотносительной роли наследственности и среды в формировании патологических признаков и в фармакогенетике.

Метод основан на изучении сходства признаков у близнецов. Близнецы – это два и более ребенка рожденные одной матерью почти одновременно. Термин «близнецы» используется по отношению к человеку и тем млекопитающим, у которых в норме чаще рождается один ребенок. Различают однояйцовых и разнаяйцовых близнецов (рис. 21).



Рис. 21. Разнаяйцовые близнецы (А), однояйцовые близнецы (Б)

Однояйцовые (монозиготные, идентичные) близнецы возникают на самых ранних стадиях дробления зиготы, когда два или четыре бластомера сохраняют способность при обособлении развиваться в отдельный полноценный организм (рис. 21). Поскольку зигота делится митозом, генотипы однояйцовых близнецов совершенно идентичны. Однояйцовые близнецы всегда одного пола, в период внутриутробного развития у них одна плацента.

Разнаяйцовые (дизиготные, неидентичные) близнецы возникают при оплодотворении двух или нескольких одновременно созревших яйцеклеток (рис. 21). Таким образом, они не имеют одинакового генотипа. Они подобны обычным братьям и сестрам по своей генетической конституции и могут быть как однополыми, так и разнополыми.

Трудности близнецового метода связаны с низкой рождаемостью близнецов в популяциях человека (частота 1:86 – 1:88).

Для идентификации монозиготности применяют полисимптомный метод сравнения близнецов по многим признакам. Более достоверный критерий – трансплантационный тест с применением перекрестной пересадки кожи.

Наиболее распространены методы основанные на иммунологической идентичности близнецов по эритроцитарным антигенам (AB0, MN, резус), по сывороточным белкам (γ-глобулину).

Сходство между однойцовыми близнецами определяется одинаковыми генотипами и сходными условиями внутриутробного развития. Сходство между разнойцовыми близнецами определяется только одинаковыми условиями внутриутробного развития. Поэтому при сравнении однойцовых и разнойцовых близнецов, воспитанных в одной и той же среде, можно сделать заключение о роли генов в развитии признаков.

Поскольку монозиготные близнецы генетически идентичны, среди монозиготных близнецов наблюдается высокий процент конкордантных пар (табл. 4).

Таблица 4

Конкордантность нормальных признаков человека

Признаки	Конкордантность монозиготных близнецов, %	Конкордантность дизиготных близнецов, %
Группа крови, АВ0	100	46
Цвет глаз	99	28
Цвет волос	97	23
Цвет кожи	100	45
Форма волос	100	79
Форма носа	98	20
Форма грудной клетки	96	60
Папиллярные линии	92	40

Как видно из таблицы 5, степень конкордантности монозиготных близнецов по всем приведенным признакам значительно выше, чем у дизиготных.

Существуют таблицы конкордантности монозиготных (МБ) и дизиготных (ДБ) близнецов по различным заболеваниям (табл. 5, 6).

**Встречаемость некоторых заболеваний
среди пар монозиготных и дизиготных близнецов**

Заболевание	Конкордантность монозиготных близнецов, %	Конкордантность дизиготных близнецов, %
Эндемический зоб	71	70
Рахит	88	22
Аллергический дерматит	28	8
Сахарный диабет	84	37

Как видно из таблицы 6, степень конкордантности монозиготных близнецов по всем приведенным мультифакториальным заболеваниям также выше, чем у дизиготных.

Таблица 6

Встречаемость инфекционных заболеваний у близнецов

Заболевание	Конкордантность монозиготных близнецов, %	Конкордантность дизиготных близнецов, %
Ангина	51	39
Дифтерия	50	37
Инфекционный гепатит	45	18
Корь	97	95
Коклюш	97	92
Пневмония	32	18
Полиомиелит	35	6
Ревматизм	26	10
Скарлатина	54	47
Туберкулез	32	20
Паротит	82	74

По признакам, в формировании которых ведущая роль принадлежит факторам среды, между близнецами наблюдается дискордантность.

Для вычисления наследуемости признаков сравнивают степень сходства (конкордантности) или различия (дискордантности) по ряду признаков у близнецов разного типа. Доля наследственности выражают в процентах.

Количественную оценку относительной роли наследственности и среды можно сделать с помощью формулы К. Хольцингера на основе расчета коэффициента наследственности **Н** (heredity) и коэффициента влияния среды **Е** (environment):

$$H = \frac{K_{MB} - K_{DB}}{100\% - K_{DB}} \times 100\%$$
$$E = 100\% - H$$

где K_{MB} – конкордантность признака (в %) для МБ; K_{DB} – то же для ДБ. Если $H = 100\%$, то можно считать, что экспрессия признака определяется только генотипом индивидуума. Если $H = 70\%$ значит, в формирование признака 70% отводится наследственности, а 30% - факторам среды ($E = 100\% - 70\% = 30\%$).

Благодаря близнецовому методу, была выяснена наследственная предрасположенность человека к ряду многофакторных заболеваний: шизофрении, эпилепсии, сахарному диабету, гипертонии и другим. Особый интерес представляет наследование социально значимых признаков: агрессивности, альтруизма, творческих, исследовательских, организаторских способностей. Считается, что перечисленные социально значимые признаки примерно на 80 % обусловлены генотипом.

Кроме того с помощью близнецового метода выявляют наследственный характер признака, определяют пенетрантность аллеля, оценивают эффективность действия на организм некоторых внешних факторов (лекарственных препаратов, обучения, воспитания).

Самостоятельная работа

Задание № 1.

В таблице 6 приведены степени конкордантности монозиготных (МБ) и дизиготных (ДБ) близнецов по различным инфекционным заболеваниям. Определите роль наследственности в заболеваемости туберкулезом.

Задание № 2.

В таблице 5 приведены степени конкордантности монозиготных (МБ) и дизиготных (ДБ) близнецов по различным соматическим заболеваниям. Определите роль наследственности в заболеваемости туберкулезом.

Ответы на задания

Задание № 1 Ответ: 15%.

Задание № 2 Ответ: 75%.

ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод, используемый для установления частот генов и генотипов в популяции и демонстрирующий характер их изменения под влиянием различных факторов, называется популяционно-статистическим.

С помощью этого метода можно:

- проанализировать генетическую структуру популяции;
- определить частоты аллелей генов и генотипов в популяциях;
- определить степень межпопуляционного генетического разнообразия;
- изучить генетический груз;
- выявить распространение наследственных признаков (наследственных заболеваний) в популяциях.

На основе изучения распространения генов среди населения различных географических регионов (генегеография) можно установить центры происхождения различных этнических групп и их миграции, определить степень риска появления той или иной наследственной патологии в конкретном регионе.

Изучением генетической структуры популяций занимается особый раздел генетики – генетика популяций.

Популяция - это совокупность особей одного вида, длительное время обитающих на определенной территории, свободно скрещивающихся друг с другом (панмиксия — свободное скрещивание), имеющих общее происхождение, определенную генетическую структуру и в той или иной степени изолированных от других таких совокупностей особей данного вида. Популяция является не только формой существования вида, но и единицей эволюции, поскольку в основе микроэволюционных процессов, завершающихся образованием вида, лежат генетические преобразования в популяциях.

В реальных популяциях (реальная популяция – действительно существующая в природе) человека наблюдается высокий уровень генетического полиморфизма, где один и тот же ген может быть представлен разными аллелями. Это приводит к существованию нескольких генотипов и соответственно разных фенотипов. Благодаря полиморфизму в популяции невозможно найти даже двух генетически одинаковых людей.

В реальных популяциях происходит изменение равновесия генотипов и аллелей под влиянием постоянно действующих факторов. К ним относятся: му-

тационный процесс, популяционные волны, изоляция, естественный отбор, дрейф генов, эмиграция, иммиграция, инбридинг. Именно благодаря этих факторов возникает элементарное эволюционное явление — изменение генетического состава популяции, являющееся начальным этапом процесса видообразования.

У человека выделяют три типа реальных популяций, которые отличаются друг от друга численностью, частотой внутригрупповых браков, долей иммигрантов, приростом населения: 1) большие (с численностью более 4 тыс), 2) демы (1,5- 3,5 тыс населения), 3) изоляты (<1,5 тыс).

Популяции человека также подразделяют на панмиксические (с возможностью свободного вступления в брак, со случайными браками) и инбредными (с высокой частотой кровнородственных браков). Население крупного города соответствует панмиктической популяции.

Идеальной - является достаточно большая (панмиктическая) популяция, в которой отсутствуют давление мутационного процесса, естественного отбора и миграции, нарушающие равновесие генов. Понятно, что идеальных популяций в природе не существует.

Для выяснения частот встречаемости генов и генотипов в больших (условно принятых за идеальные) популяциях человека используется закон Харди-Вайнберга:

«В идеальной популяции из поколения в поколение сохраняется строго определенное соотношение частот доминантных и рецессивных аллелей генов, а также соотношение частот генотипических классов»

Закон Харди-Вайнберга:

$$p(A)+q(a)=1(100\%)$$

$$p^2(AA)+2pq(Aa)+q^2(aa)=1(100\%)$$

где p - частота встречаемости доминантного аллеля A ;

q - частота встречаемости рецессивного аллеля a ;

p^2 - частота встречаемости гомозигот по доминанте AA ;

$2pq$ - частота встречаемости гетерозигот Aa ;

q^2 - частота встречаемости гомозигот по рецессиву aa .

Закон Харди-Вайнберга употребляется для примерного подсчета носителей рецессивных аллелей генов наследственных заболеваний.

Пример:

Известно, что в одной популяции фенилкетонурия встречается с частотой 1:10000. Фенилкетонурия наследуется по аутосомно-рецессивному типу, следовательно, больные фенилкетонурией имеют генотип **aa**, то есть $q^2=0,0001$. Отсюда: $q=0,01$; $p=1-0,01=0,99$. Гетерозиготные носители рецессивного гена имеют генотип **Aa**. Частота встречаемости гетерозигот ($2pq$) составляет $2 \cdot 0,99 \cdot 0,01 \approx 0,02$. Вывод: в данной популяции около 2% населения — фенотипически здоровые носители гена фенилкетонурии. Частота встречаемости здоровых людей с гомозиготным геном по доминанте (**AA**): $p^2=0,992 \approx 98\%$.

В том случае, если ген в генофонде представлен несколькими аллелями (например ген группы крови системы АВ0), то принцип Харди-Вайнберга остается в силе.

Соотношение различных генотипов выражается формулой:

$$pI^A + qI^B + rI^0 = 100\%$$

Например: на Ближнем Востоке группы крови системы АВ0 встречаются в следующем процентном соотношении:

0(I) - 27,3%

A(II) - 38,5%

B(III) - 25,5%

AB(IV) - 8,7%

Определить частоту аллелей I^A , I^B , I^0 и разных генотипов в этой популяции можем, воспользовавшись следующими формулами при решении задачи:

$$p(I^A) = \sqrt{(A + 0)} - \sqrt{0};$$

$$q(I^B) = \sqrt{(B + 0)} - \sqrt{0};$$

$$r(I^0) = \sqrt{0}$$

где A – частота группы крови A(II); 0 – частота группы крови 0(I); B – частота группы крови B(III).

$$r(I^0) = \sqrt{0,273} = 0,52;$$

$$p(I^A) = \sqrt{0,385 + 0,273} - \sqrt{0,273} = 0,8112 - 0,5225 = 0,28;$$

$$q(I^B) = \sqrt{0,255 + 0,273} - \sqrt{0,273} = 0,7266 - 0,5225 = 0,20$$

Таким образом, частота аллелей $pI^A = 28\%$; $qI^B = 20\%$; $rI^0 = 52\%$.

Для сбора материала используется обзорный метод, с помощью которого можно исследовать всю наследственную патологию, или отдельную группу заболеваний, или только одно заболевание, но изучая при этом все население выбранного региона.

Для получения достоверных результатов популяция должна быть достаточно большой, для генетических исследований оптимальным является размер популяции с численностью от 0,5 до 5,0 млн. человек.

Исследования доказали, что распределение частот аллелей и их изменение в популяциях, зависят от влияния движущих сил эволюции: мутагенеза, дрейфа генов, миграционного процесса, изоляции и естественного отбора.

Возьмем пример действия естественного отбора на популяцию человека. Отбор действует как во внутриутробном состоянии, так и в последующие периоды онтогенеза. Наиболее выражен стабилизирующий отбор, направленный против неблагоприятных мутаций (например, хромосомных перестроек). Классический пример отбора в пользу гетерозигот – распространение серповидноклеточной анемии. У людей больных серповидноклеточной анемией наблюдается гетерозиготный генотип, так как гомозиготы погибают еще в детстве.

Наследственные заболевания распределены по различным регионам земного шара, среди разных рас и народностей неравномерно. Данные о распространении заболеваний и количестве гетерозиготных носителей в конкретном регионе имеет большое практическое значение, т.к. способствуют эффективной организации профилактических мероприятий.

Самостоятельная работа

Задание № 1.

Альбинизм у человека обусловлен редким рецессивным геном, распространенным в популяции людей (Европейской части) с частотой 1 на 10000. Определите генетическую структуру популяции.

Задание № 2.

Частота групп крови системы АВ0 среди людей в разных популяциях существенно отличается (табл.7).

Частота групп крови системы АВ0

Популяция	Группа крови системы АВ0			
	0	A	B	AB
Индейцы	77	22	0	0
Немцы	36	61	2	0,5
Полинезийцы	37	42	15	7
Египтяне	27	39	25	8

Определите, в какой из представленных в таблице 7 групп населения наиболее часто встречается аллель pI^A

Ответы на задания**Задание № 1**

Решение. Если аллель нормальной пигментации обозначить **A**, аллель альбинизма **a**, то генотип альбиносов будет **aa**, а генотипы нормально пигментированных людей – **AA** и **Aa**. По условию задания в популяции частота альбиносов составляет 1 на 10000. Согласно закону Харди-Вайнберга, в данной популяции частота гомозигот $q^2(aa)=1:10000=0,0001$ (0,01%), а частота рецессивного аллеля $\sqrt{q^2}=0,01$. Частота доминантного аллеля $p(A)=1-q(a)=1-0,01=0,99$. Частота нормально пигментированных людей составляет $p^2(AA)=0,99^2=0,98(98\%)$, а частота гетерозигот $2pq(Aa)=2\cdot 0,99\cdot 0,01=0,198(1,98\%)$.

Задание №2

Ответ: У полинезийцев 38% (индейцы 11%; немцы 29%; египтяне 29%).

ДЕРМАТОГЛИФИЧЕСКИЙ МЕТОД

Пуркинье Я. (1823 г.) изучил рельеф кожных узоров и разработал основы их классификации. Ф. Гальтон установил, что кожные узоры являются индивидуальной характеристикой человека и не изменяются в течение его жизни. Гальтон дополнил классификацию кожных узоров и в 1892 г. предложил дерматоглифический метод.

Основан метод на изучении кожных узоров (папиллярных линий) пальцев, ладоней (рис. 22) и подошвенных поверхностей стоп, образованных эпидермальными выступами (гребнями).



Рис. 22. Папиллярные линии пальцев и ладоней.

Разделы дерматоглифики:

- дактилоскопия – изучение узоров на подушечках пальцев;
- пальмоскопия – изучение рисунка на ладонях;
- плантоскопия – изучение дерматоглифики подошвенной поверхности стопы.

Гребни на коже пальцев рук соответствуют сосочкам дермы, поэтому их называют папиллярными линиями, рельеф этих выступов повторяет пласт эпидермиса. Межсосочковые углубления образуют бороздки. Закладка узоров происходит между 10 и 19 неделями внутриутробного развития. У 20 недельных плодов уже хорошо различимы формы узоров. Формирование папиллярного рельефа зависит от характера ветвления нервных волокон. Полное формирование деталей строения тактильных узоров отмечается к шести месяцам, после чего они остаются неизменными до конца жизни.

Папиллярные линии подушечек пальцев могут иметь вид дуги, петли, завитка (рис. 23).



Дуга

Петля

Завиток

Рис. 23. Разновидности пальцевых узоров: дуга, петля, завиток.

Дактилоскопические исследования имеют важное значение в диагностике некоторых наследственных заболеваний, в судебной медицине, в криминалистике для идентификации личности.

Пальмоскопия

В настоящее время определена наследственная обусловленность кожных узоров. Это доказано многими генетическими исследованиями, в частности, на монозиготных близнецах.

Обширные исследования по изучению особенностей дерматоглифики проведены у нас в стране Т.Д. Гладковой (1996 г.), а по наследственной обусловленности кожных узоров – И.С. Гусевой (1970 г.). На основании этих работ был сделан вывод, что количественные показатели гребневого рельефа кожи программируются полигенно. Гены гребней кожи проявляют свой морфогенетический эффект, влияя на степень ветвления нервного волокна, и фенотипически определяют гребневую плотность.

На характер пальцевого и ладонного узоров также оказывает влияние материнский организм через механизм цитоплазматической наследственности.

На формирование дерматоглифических узоров могут оказывать влияние некоторые повреждающие факторы на ранних стадиях эмбрионального развития.

Дерматоглифические исследования используются при идентификации зиготности близнецов. Сходство узоров менее чем на 7 пальцах из 10 - свидетельствует в пользу дизиготности близнецов, если более, то это указывает на монозиготность.

В качестве обобщенного показателя потенциальных возможностей человека спортсмены используют так называемый дельтовый индекс, зависящий от сложности пальцевых узоров. Наиболее простой рисунок – дуга оценивается в 0 баллов, петля – 1 балл, завиток – 2 балла. Максимальный показатель (исходя из суммы 10 пальцев) – 20 баллов. Низкий дельтовый индекс (до 10) характеризует скоростно-силовые качества (рекомендуется заниматься легкой атлетикой). Средний (от 10 до 13) – показатель выносливости (рекомендуется лыжный спорт). Высокий (выше 13) – показывает на способности к сложной координированной деятельности (занятия боксом).

Ладонный рельеф очень сложный, в нем выделяют ряд полей, подушечек и ладонных линий. У правшей более сложные узоры встречаются на правой руке, у левшей – на левой.

Установлено, что у людей с синдромом Дауна наблюдаются специфические изменения не только рисунков пальцев и ладоней, но и ладонного угла, характера основных сгибательных борозд на коже ладоней (рис. 24).

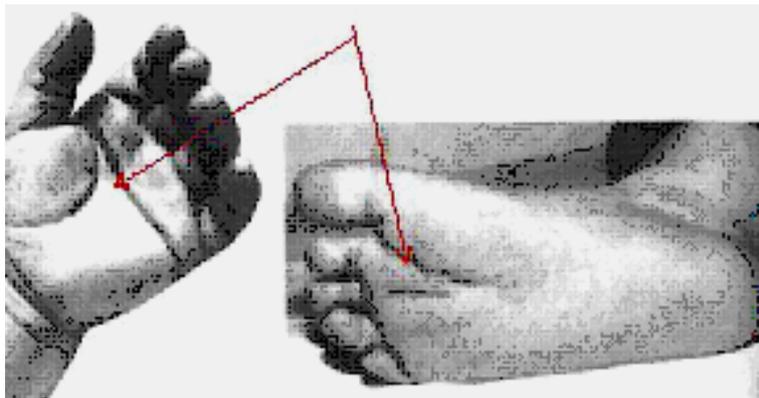


Рис. 24. Поперечная складка ладони и стопы у больного синдромом Дауна.

Наблюдаются дерматоглифические особенности и при других хромосомных мутациях. Например, при синдроме Эдвардса часто обнаруживаются дуги на всех пальцах. При синдроме Шершевского-Тернера – завитки на всех пальцах. Описаны специфические дерматоглифические отклонения при шизофрении, миастении, лимфоидной лейкемии.

Самостоятельная работа

Задание. Подсчитайте дельтовый индекс у себя и сделайте заключение.

БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

Биохимический метод применяется в основном при дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена веществ.

Биохимический метод позволяет обнаружить нарушения в обмене веществ, вызванные изменением генов и, как следствие, изменением активности различных ферментов. Наследственные болезни обмена веществ подразделяются на болезни углеводного обмена (сахарный диабет), обмена аминокислот (фенилкетонурия), липидов, минералов и др.

Многие наследственные заболевания, связанные с нарушениями обмена веществ, диагностируются с помощью биохимических методов. Они позволяют выявить либо аномальные белки-ферменты, либо промежуточные продукты обмена, свидетельствующие о наличии болезни. Сегодня установлено более 1 тыс. заболеваний и нарушений обмена веществ у человека, имеющих наследственную природу.

Все биохимические методы делят на качественные, количественные и полуколичественные. Для исследования берутся кровь, моча или амниотическая жидкость. Качественные реакции позволяют обнаружить избыточные концентрации субстратов блокированной ферментной реакции или их производных. Качественные тесты чувствительны, просты в применении, отличаются низкой себестоимостью и не дают ложноотрицательных результатов, а информация, полученная с их помощью, позволяет с высокой долей вероятности заподозрить патологию у пациента. Качественные методы менее трудоемкие, поэтому применяются для массового скрининга (например, исследование новорожденных в роддоме на фенилкетонурию).

Все многообразие качественных биохимических методов делится на две группы:

а) методы, основанные на выявлении определенных биохимических продуктов, обусловленных действием разных аллелей. Легче всего выявлять аллели по изменению активности ферментов или по изменению какого-либо биохимического признака;

б) методы, основанные на непосредственном выявлении измененных нуклеиновых кислот и белков с помощью гель-электрофореза в сочетании с другими методиками (блот-гибридизации, авторадиографии).

Однако на результаты этих тестов влияет применение ряда лекарственных препаратов и их метаболитов, а также некоторых пищевых добавок. Качественные пробы бывают: универсальными (тест для мукополисахаридов) и специфическими (для определения цистин-гомоцистина, метилмалоновой кислоты и др.). Наиболее распространены качественные тесты с мочой, вследствие доступности и простоты получения материала для исследования.

Универсальность этих методов позволяет их использовать для дифференциальной диагностики с другой моногенной патологией, при которой изменение биохимических показателей является вторичным. Например, при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера у носительниц этого гена повышен уровень креатин-фосфокиназы в крови. То же наблюдается у больных при некоторых других заболеваниях в развернутой стадии.

Для диагностики ряда состояний используют комбинированные биохимические методы. Иммуно-гистохимический метод используется для выявления белковой субстанции в какой-либо ткани при помощи специфичных антител (именно так проводят дифференциальную диагностику прогрессирующих мышечных дистрофий и прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера). Иммуногенетическое тестирование позволяет поставить или уточнить диагноз при врожденных иммунодефицитных состояниях, при подозрении на антигенную несовместимость матери и плода по тем или иным системам групп крови.

Полуколичественные и количественные тесты проводятся как с мочой (тест с цианид-нитропруссидом – при гомоцистинурии, ЦПХ-тест - при мукополисахаридозах), так и с кровью (газы крови, глюкоза, ионы аммония, молочная кислота, кетоновые тела и др.) и могут иметь различную степень сложности. Наиболее простые из них, такие как измерение концентрации лактата, или кетоновых тел, или определение кислотно-щелочного равновесия, позволяют планировать дальнейшую тактику диагностики. Так метаболический ацидоз служит показанием для проведения газовой хроматографии. Определение концентрации кетоновых тел в крови является первым этапом для дифференциальной диагностики митохондриальных болезней.

В диагностике нарушений обмена веществ применяют сложные и высокоточные количественные методы, такие как флуориметрические, спектрофотометрия, различные виды хроматографии.

Использование количественных биохимических методов позволяет выявить гетерозиготных носителей заболеваний. Например, фенилкетонурия (ФКУ) относится к болезням аминокислотного обмена. При ФКУ блокируется превращение незаменимой аминокислоты фенилаланин в тирозин, при этом фенилаланин превращается в фенилпировиноградную кислоту, которая выводится с мочой. Определение количества фенилпировиноградной кислоты в моче позволит выявить генотип и диагностировать заболевание.

С каждым годом совершенствуются биохимические методы и становятся все более сложными, многоступенчатыми, а следовательно, дорогими. Использовать их для массового скрининга наследственных болезней, многие из которых встречаются в популяциях человека со сравнительно низкой частотой, невыгодно.

МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Биологическое моделирование наследственных болезней представляет собой большой раздел экспериментальной биологии и генетики. Теоретическую основу биологического моделирования в генетике дает закон гомологических рядов наследственной изменчивости, открытый Н.И. Вавиловым. Согласно закону «генетически близкие виды и роды характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости». Исходя из этого положения, можно предвидеть, что у некоторых животных, можно обнаружить мутации, вызывающие такие же изменения фенотипических признаков, как и у человека.

Для моделирования определенных наследственных аномалий человека подбирают и изучают мутантные линии животных, имеющих сходные нарушения. Были описаны и изучены многие генные мутации у животных, имеющих сходство с соответствующими наследственными аномалиями человека. Например, гемофилия А и В встречается у крыс, и обусловлена как и у человека, рецессивными генами, локализованными в X-половой хромосоме. У собак обнаружены патологические мутации, проявляющиеся как гемофилия, сахарный диабет, ахондроплазия, мышечная дистрофия. Эпилептические припадки встречаются у крыс под воздействием сильного звукового раздражителя.

Используется метод и для создания моделей наследственных болезней человека с помощью трансгенных животных.

Мутантные линии животных путем возвратного скрещивания привели к генетическому сходству, в результате получили линии, различающиеся только по аллелям одного гена. Это дало возможность уточнить механизм развития многих наследственных аномалий. Мутантные линии животных не являются точным воспроизведением наследственных болезней человека. Однако, даже частичное моделирование, то есть воспроизведение не всего заболевания в целом, а только патологического процесса или даже его фрагмента, позволяет в ряде случаев обнаружить механизмы первичного отклонения от нормы у человека.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Иммуногенетический метод включает использование серологических проб (ИФА, РНГА), иммуноэлектрофореза (ИЭФ), которые используют для изучения групп крови, белков и ферментов сыворотки крови и тканей. С его помощью можно установить иммунологическую несовместимость индивидуумов, выявить иммунодефицитные состояния, зиготность близнецов.

Важным разделом иммуногенетики является генетика групп крови. В настоящее время известно более 200 основных систем групп крови. Из них наиболее изучены системы АВ0 и резус-фактор.

Система крови «резус-фактор»

В генотипе человека есть три гена (С, D, Е), определяющих образование в организме особого белка, называемого резус-фактором. Наиболее иммуногенным является ген, обозначаемый D (d).

Человек, гомозиготный DD или гетерозиготный Dd по данному гену, является резус-положительным Rh+, т.е. имеет этот белок в эритроцитах крови. А в случае гомозиготности по рецессивному аллелю dd (rh-) резус-фактор в крови отсутствует. И если он попадает в кровь такого человека (при переливании крови), в его организме развивается защитная реакция – как на любой чужеродный белок, и образуются специфические антитела.

В браках резус-отрицательных женщин с резус-положительными гомозиготными мужчинами, вследствие доминирования резус-положительности, плод является резус-положительным и в крови появляется резус-фактор. Против резус-фактора в организме матери вырабатываются антитела, разрушающие кровеносную систему плода. В результате резус-конфликта страдает как организм матери, так и организм плода. У ребенка развивается гемолитическая желтуха новорожденных.

В браке резус-отрицательной женщины с резус-положительным мужчиной, гетерозиготным по этому признаку плод может оказаться резус-отрицательным и резус-положительным. В случае если плод окажется резус-отрицательным, тогда конфликт с организмом матери не возникает.

Помимо вероятности возникновения самой ситуации резус-конфликта, определяемой исключительно генотипами родителей, важное значение имеет и

степень тяжести развивающейся реакции. В некоторых случаях резус-конфликт протекает почти незаметно, в других может стать причиной гибели ребенка. Обычно более тяжелые последствия наблюдаются при второй и последующих беременностях.

Статистика показывает, что среди европейцев примерно 85% людей резус-положительные и только 15% резус-отрицательные.

Самостоятельная работа

Задание. Определите, по возможности, наследование резус-фактора в своей семье и сделайте прогноз потомства.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Молекулярно-генетические методы (МГМ) анализа ДНК позволяют установить молекулярную причину патологии человека или проявления генных мутаций. МГМ направлены на определение структурных и функциональных особенностей одного или нескольких генов, или всего генома в целом. Определение структурных особенностей генов основано на определении последовательности нуклеотидов в интересующем фрагменте ДНК.

Применение методов МГМ

Клиническая лабораторная диагностика:

- определение вирусных инфекций (ВИЧ, гепатит, половые и др.),
- установление генных болезней (выявление мутаций)

Судебная медицина:

- идентификация личности,
- определение отцовства

Фундаментальная наука и практика:

- секвенирование (определение нуклеотидной последовательности),
- клонирование генов,
- генная инженерия (создание трансгенных животных и растений),
- генная терапия,
- направленный мутагенез.

Первым этапом любого молекулярно-генетического исследования является *выделение нуклеиновых кислот*.

Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения ДНК пригодны любые ядродержащие клетки организма. Чаще всего на практике используется периферическая кровь (лейкоциты). Для выделения ДНК применяется обработка крови солевыми растворами различной концентрации для разрушения плазматической мембраны и ядерной оболочки, инкубирование с протеиназами для расщепления белков, связанных с ДНК и очистка препаратов, например, смесью фенола и хлороформа (рис. 25).

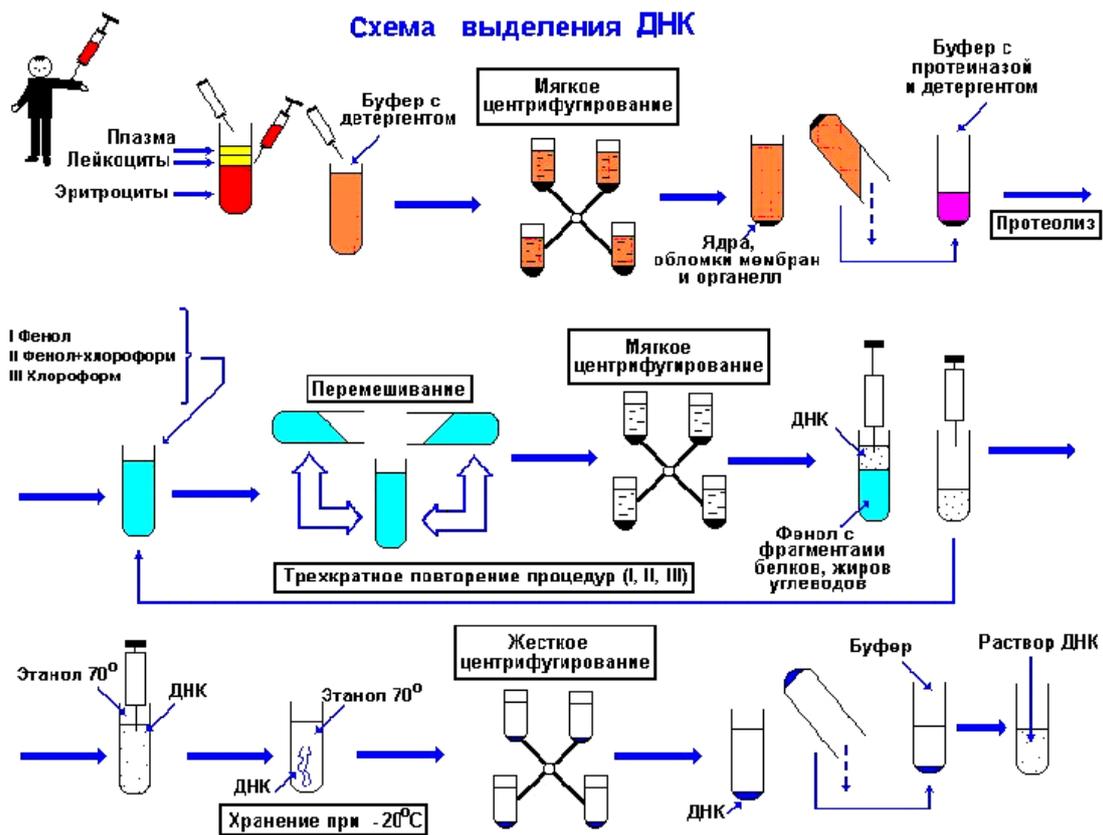


Рис. 25. Схема выделения ДНК.

В большинстве случаев для анализа (например, для диагностики болезни) достаточно исследования небольшого фрагмента генома. Для этого исследуемый фрагмент необходимо получить в большом количестве копий. Амплифицировать фрагмент ДНК можно при помощи методов *молекулярного клонирования и полимеразной цепной реакции (ПЦР)*.

Клонирование ДНК

Клонирование ДНК - это размножение отдельных фрагментов ДНК путем включения их через бактериальные плазмиды в генетический материал микроорганизмов. Это позволяет получать большое количество определенных фрагментов ДНК для проведения их анализа или получения различных функционально активных белков человека и использовать их для терапии некоторых заболеваний.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод ПЦР – амплификации (увеличение количества копий) ДНК *in vitro* позволяет в течение нескольких часов получить большое количество копий исследуемой ДНК.

Возможность осуществления репликации ДНК в пробирке давно интересовала ученых. Особенно интересной представлялась возможность накопления большого количества копий ДНК для последующих исследований. Этот процесс стал возможным после открытия термостабильной Таг-полимеразы ДНК из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*. Принцип метода ПЦР был разработан Кэри Мюллисом (США, 1983 г.) и в настоящее время используется как для научных целей, так и для диагностики наследственных болезней в практическом здравоохранении.

В основе метода ПЦР лежит комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляемое в пробирке с помощью фермента ДНК-полимеразы (т.е. осуществляется репликация). Обычная ДНК-полимераза не может работать при высоких температурах. Оптимум работы Таг-полимеразы находится в области 70-72°C, что позволило сделать процесс репликации циклическим. При многократном повторении циклов синтеза происходит многократное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала получить достаточное количество копий ДНК для идентификации их методом электрофореза.

Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направлять процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине цепи. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки – праймеры. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

Состав и параметры ПЦР реакции

Для проведения амплификации в пробирку необходимо поместить следующие компоненты: деионизированную воду, буфер, содержащий ионы магния, два праймера, смесь из четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, Таг-полимеразу и матрицу – молекулу ДНК, которую необходимо копировать.

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных условиях.

1 этап: Денатурация ДНК.

Протекает при 93-95°C в течение 30-40 сек (рис. 26).

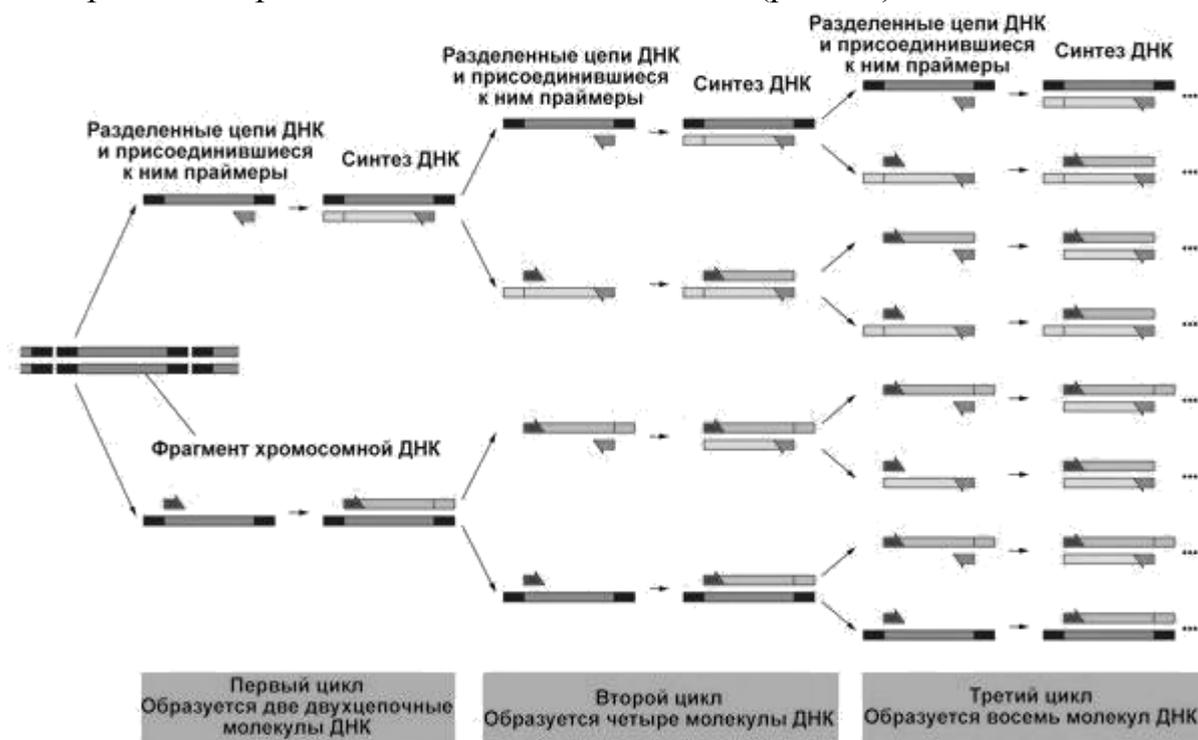


Рис. 26. Схема ПЦР (<http://elementy.ru/lib/430350>)

2 этап: Присоединение праймеров (отжиг).

Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах соответствующего участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65 °С. Время отжига составляет 20-60 сек.

3 этап: Достаивание цепи (элонгация).

Комплементарное достаивание двух разных цепей ДНК происходит в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров, от 5'-конца к 3'-концу. Материалом для синтеза новых цепей служат добавляемые в раствор нуклеотиды. Синтез происходит при температуре 70-72°C, время синтеза – 20-40 сек. Образовавшиеся в первом цикле амплификации цепи ДНК служат матрицами для нового цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (амплификона). В последующих циклах амплификации амплификоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, происходит накопление амплификонов в растворе по формуле 2^n , где n- число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась всего одна двухцепочечная мо-

лекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10^8 в восьмой степени (10^8) молекул амплификона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции амплификона методом электрофореза в геле. Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате - амплификаторе (рис. 27), который по заданной программе осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.



Рис. 27. Амплификатор

Электрофорез фрагментов ДНК

Электрофорез применяется для визуализации результатов ПЦР, ПДРФ и др. (рис. 28).

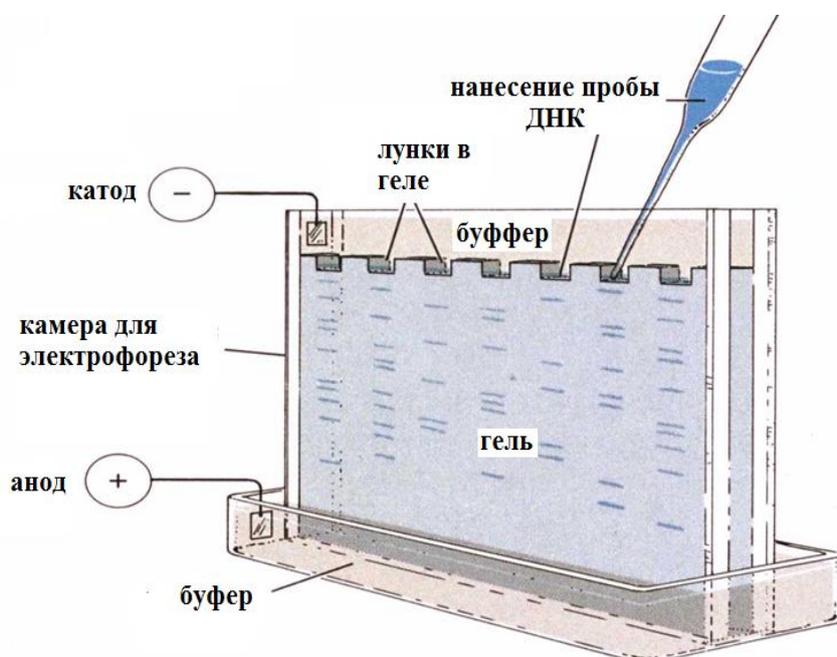


Рис. 28. Камера для электрофореза в полиакриламидном геле.

Образцы ДНК наносятся в специальные лунки в геле. В камеру заливается буферный солевой раствор, через который пропускается электрический ток.

Электрофорез фрагментов ДНК обеспечивает разделение разных фрагментов ДНК в агарозном или полиакриламидном (ПААГ) геле. Фрагменты ДНК движутся с разной скоростью в геле, помещенном на стеклянной или пластиковой подложке в постоянном электрическом поле от отрицательного полюса к положительному, в зависимости от размеров и заряда (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента и меньше заряд, тем медленнее он движется в электрическом поле). После окончания электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде отдельной полосы в конкретном месте геля. Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения пройденного фрагментом расстояния с расстоянием, пройденным стандартными образцами ДНК или маркером. После окончания электрофореза ДНК необходимо окрасить для ее визуализации. Для этого используют флуоресцентные красители, например, растворимые соли серебра (AgNO_3) или этидиум бромид (рис. 29).

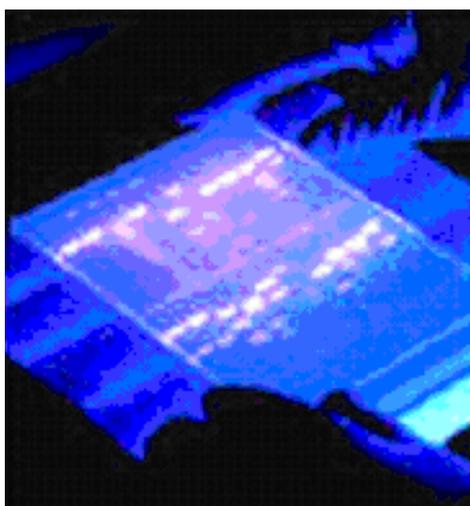


Рис. 29. Агарозный гель окрашенный этидиум бромидом.

В ультрафиолетовом свете видны полосы, соответствующие фрагментам ДНК разной длины.

При окраске этидиум бромидом полосы, соответствующие фрагментам ДНК выявляются при ультрафиолетовом облучении геля (свечение в красной области спектра).

При использовании ПЦР с последующим разделением фрагментов при помощи электрофореза можно обнаружить делеции и вставки в исследуемом гене. В случае делеций после ПЦР образуются фрагменты меньшей длины по сравнению с нормальным геном, а в случае вставок (дупликаций) – большей.

Замены оснований не изменяют длину фрагментов, поэтому для их определения после ПЦР можно использовать *метод анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов и секвенирование*.

Общий принцип real-time PCR

В настоящее время в практическое здравоохранение внедряется новая технология ПЦР – это ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, Real-Time PCR). Ее принципиальной особенностью является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции, а также автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Существует два основных подхода к получению результатов ПЦР в реальном времени: с помощью красителей и на основе флуоресцентно-меченых зондов (рис. 30, 31).

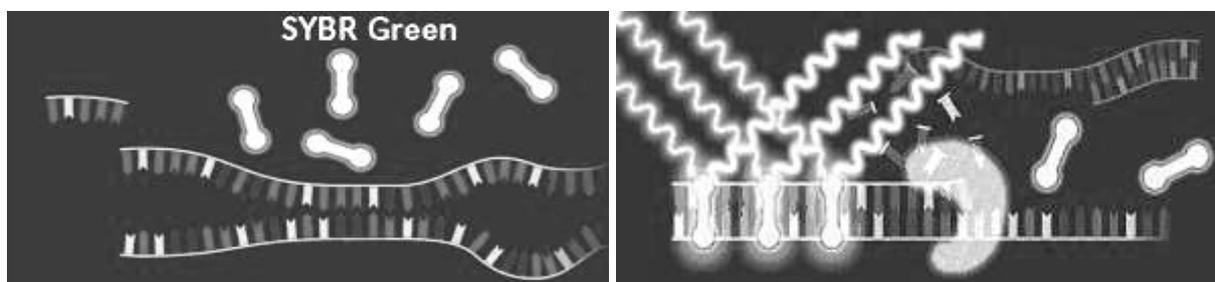


Рис. 30. Принцип работы красителей в real-time PCR.

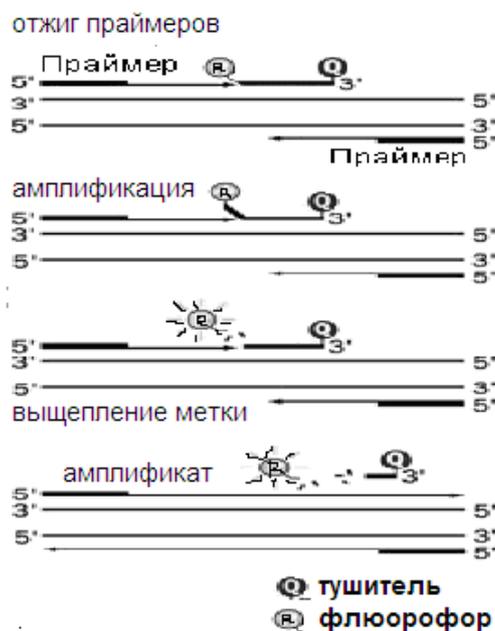


Рис. 31. Принцип работы флуоресцентных зондов типа Tag-Man в real-time PCR.

Метод real-time PCR не требует стадии электрофореза и в последние годы успешно применяется в крупнейших санитарно-эпидемических, диагностиче-

ских и научно-исследовательских центрах развитых стран мира, замещая ПЦР в ее «классическом» варианте.

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР синтеза ДНК (ПЦР-ПДРФ)

Метод ПЦР-ПДРФ основан на способности ферментов – рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз) расщеплять двухцепочечную ДНК в участках с определенной нуклеотидной последовательностью – так называемых сайтах рестрикции. Изменения нуклеотидной последовательности в любой цепи ДНК в сайте рестрикции делает его неузнаваемым для рестриктазы.

В настоящее время известно более 500 рестриктаз, что позволяет достаточно часто использовать данный метод для диагностики точечных (SNP — *single nucleotide polymorphism*) мутаций и полиморфизмов.

Значительное число нуклеотидных замен приводит к появлению в последовательности ДНК новых участков узнавания для различных рестриктаз или исчезновению существовавших. В результате нормальный фрагмент ДНК и фрагмент с заменой нуклеотида будут разрезаться одной рестриктазой на разное число фрагментов, отличающихся по длине.

Примером может служить рестрикционный анализ промоторной области гена одного из белков сурфактанта легких человека *SFTPВ* рестриктазой *Bsc4I* (рис. 32).

ПДРФ маркер АС АС СС АС АС АС СС АА АА АС генотипы

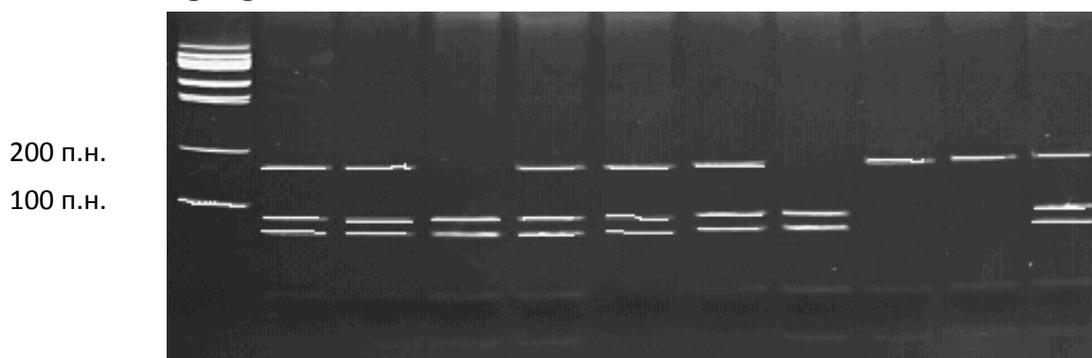


Рис. 32. Результаты электрофореза анализа ПДРФ промоторной области гена *SFTPВ* (рестриктаза *Bsc4I*).

Различной длины фрагменты легко выявляются при помощи электрофореза.

Обратно-транскриптазная ПЦР (RT-PCR)

Принципы ПЦР используют и для амплификации РНК. Выполнение данной реакции требует дополнительного этапа — синтеза комплементарной ДНК (сDNA) на матрице мРНК. Данная реакция осуществляется за счет фермента

обратной транскриптазы, отсюда и метод амплификации РНК получил название полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией – ОТ-ПЦР (*RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction*).

Инкубирование биологического материала с нуклеотидами (dATP - аденин, dTTP - тимин, dGTP - гуанин, dCTP - цитозин) и обратной транскриптазой происходит в буферном растворе, как правило, при 37°C в течение часа.

Циклы ОТ-PCR производятся по стандартной методике ПЦР. ОТ-ПЦР используют для диагностики генетических заболеваний и количественного определения наследственного материала в клетках и оценки уровня экспрессии генов.

Секвенирование

Секвенирование – метод определения нуклеотидной последовательности ДНК. Метод применяется для изучения генома человека, как в норме, так и в патологии. При помощи секвенирования определяют аллельные варианты генов, а также различные типы генных мутаций (чаще замены оснований).

Существует несколько различных способов секвенирования ДНК. Первым был предложен химический метод Максама-Гилберта, затем ферментативный *метод Сенгера*, который в настоящее время в основном и применяется.

В этой процедуре одноцепочечная молекула ДНК, последовательность которой определяется, служит матрицей для синтеза серии комплементарных цепей, обрывающихся в момент присоединения к растущей цепи специфических нуклеотидов. Для обрыва синтеза используют дидезоксинуклеотиды – искусственно синтезированные нуклеотиды, лишенные 2' и 3'- гидроксильных групп и поэтому не способные присоединять к цепи следующий нуклеотид. Проба ДНК делится на 4 пробирки, в которые добавляют праймер, ДНК-полимеразу, смесь четырех дидезоксинуклеотидов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) и небольшое количество одного из дидезоксирибонуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ). Во время синтеза ДНК-полимераза случайным образом включает в цепь нормальные нуклеотиды и дидезоксинуклеотиды. При этом в каждой пробирке образуется набор фрагментов разной длины, заканчивающихся на один из дидезоксинуклеотидов.

После этого проводится электрофорез, что позволяет разделить отличающиеся на один нуклеотид фрагменты ДНК. В результате в геле образуется набор полос, напоминающих лестницу. Нуклеотидная последовательность ДНК читается в геле снизу вверх, согласно направлению 5'-3' цепи ДНК. Для опреде-

ления нуклеотидной последовательности больших фрагментов ДНК используются автоматизированные машины (ДНК-секвенаторы).

Современные методы полногеномного секвенирования

Метод Сэнгера реализован к настоящему времени в ряде современных автоматических секвенаторов. Последние отличаются по типу проводимого электрофореза (на гелевых пластинах или в капиллярах) и по количеству детектируемых красителей: один, два или четыре. Капиллярные секвенаторы выпускают только в варианте, использующем детекцию четырех флюоресцентных красок. В качестве красителей используют флюоресцеиновые и родаминовые соединения (рис. 33).

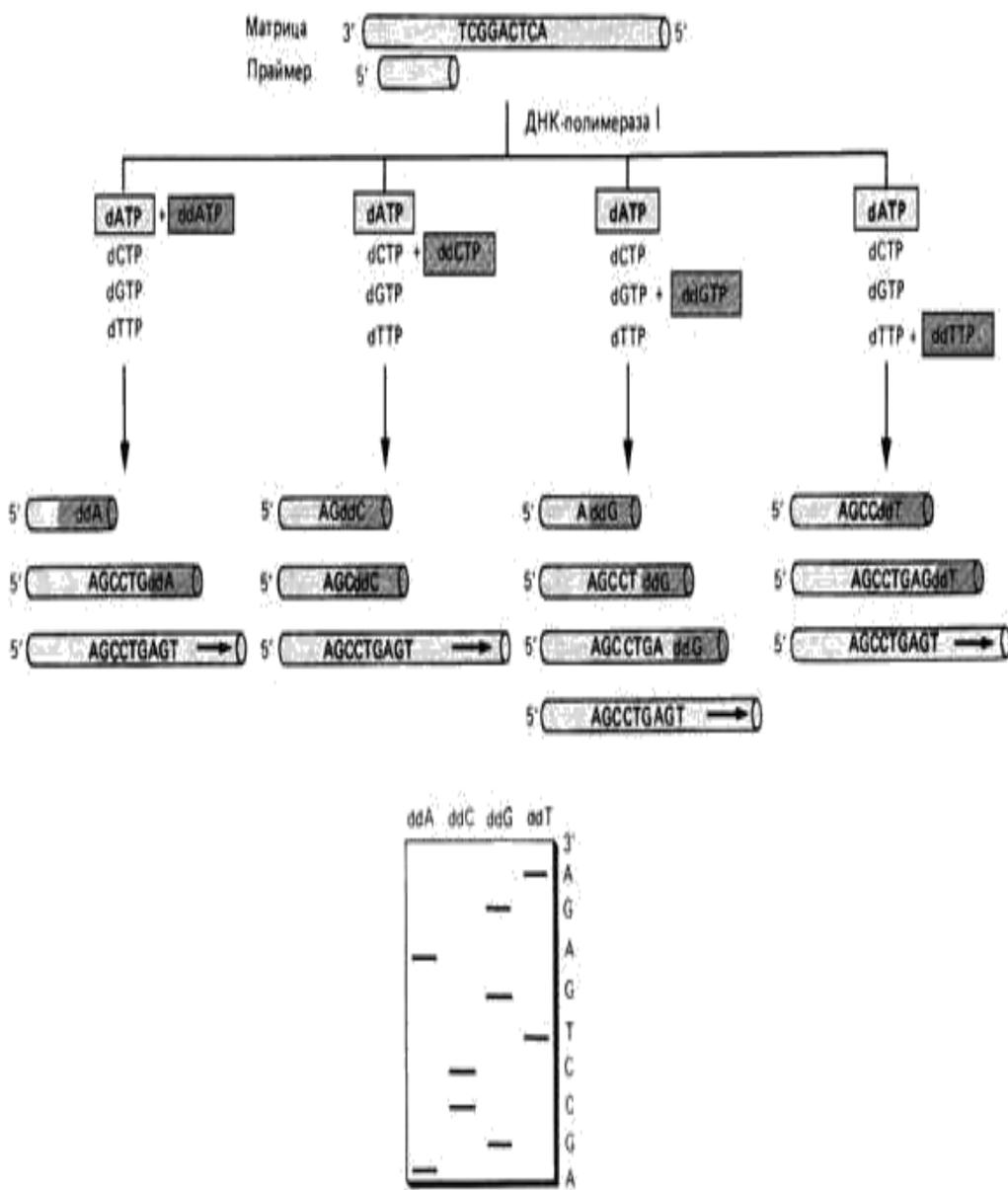


Рис. 33. Принцип метода секвенирования по Сэнгеру (www.dia-m.ru)

Таким образом, молекулярно-генетические методы часто используются для выявления генных мутаций. Около 1% новорожденных заболевают вследствие генных мутаций, из которых часть вновь возникшие. Темп мутирования различных генов в генотипе человека неодинаков. Известны гены, которые мутируют с частотой 10 на гамету в поколении. Однако большинство генов мутируют с частотой, в сотни раз меньшей (табл. 8).

Таблица 8.

Примеры наиболее частых генных мутаций у человека

№	Типы и названия мутаций	Частота мутаций
<i>Аутосомно-доминантные</i>		
1.	Поликистоз почек	65 – 120
2.	Нейрофиброматоз	11 – 100
3.	Множественный полипоз толстой кишки	10 – 50
4.	Аномалия лейкоцитов	9 – 27
5.	Синдром Марфана	4 – 6
<i>Аутосомно-рецессивные</i>		
1.	Микроцефалия	27
2.	Ихтиоз (не сцепленный с полом)	11
<i>Рецессивные, сцепленные с полом</i>		
1.	Мышечная дистрофия Дюшена	43 – 105
2.	Гемофилия А	37 – 52
3.	Гемофилия В	2 – 3
4.	Ихтиоз	24

В настоящее время мутационный процесс у человека характеризуется тем, что протекает на фоне повышенной концентрации мутагенных факторов, созданной производственной деятельностью самого человека. Важнейшая задача сегодняшнего дня – выявление мутагенных свойств загрязнителей, особенно новых химических веществ (лекарств, пестицидов, пищевых добавок, различных видов топлива и т.д.), и разработка методов технологии, позволяющих предотвратить возникновение опасных концентраций этих агентов.

Одним из сильнейших мутагенов является радиация (ионизирующие излучения). Доказано, что не существует пороговой дозы ионизирующих излучений. Другими словами, индукция мутаций может быть достигнута при действии

любых доз, а при увеличении дозы пропорционально растет число мутаций. Мутагенным действием на клетки человека обладают и некоторые вирусы, причем даже в ослабленной форме, которая используется для приготовления вакцин. Известно также, что большинство мутагенов обладают и канцерогенными свойствами, то есть они могут индуцировать развитие злокачественных опухолей.

В то же время существуют внешние факторы, которые снижают частоту мутаций – антимутагены. К антимутагенам относятся некоторые витамины – антиоксиданты (например, витамин Е, ненасыщенные жирные кислоты), серо-содержащие аминокислоты, а также различные биологически активные вещества, которые повышают активность репарационных систем.

Примеры наиболее распространенных наследственных заболеваний человека

На сегодняшний день описано около 10 000 наследственных заболеваний человека. Среди них моногенные и мультифакториальные.

Галактоземия

Характеризуется невозможностью усваивать молочный сахар (галактозу). Аутосомно-доминантный тип наследования заболевания. Обусловлено недостаточной активностью фермента, обеспечивающего превращение галактозы в глюкозу. У гетерозигот *Aa* активность указанного фермента составляет 50% от нормы, а у гомозигот *aa* – 10% нормы. При этом заболевании наблюдаются поражение печени и селезенки, диспепсические расстройства, катаракта и умственная отсталость. Частота заболевания составляет 1:50000 новорожденных; частота гетерозиготных носителей – 1:100. Диета, не содержащая молочного сахара, предотвращает развитие симптомов.

Алкаптонурия

Заболевание развивается при неполном окислении гомогентизиновой кислоты в организме. Аутосомно-рецессивный тип наследования заболевания. Проявляется в виде артритов конечностей и позвоночника. Сопутствующим признаком является появление «мышинного» запаха мочи у больных людей. Это первое заболевание, для которого была доказана молекулярно-генетическая природа возникновения (А. Гаррод, 1909).

Муковисцидоз

Относится к наиболее тяжелым наследственным заболеваниям человека. Характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования. Называется также *кистозный фиброз поджелудочной железы*.

В среднем один из 20 представителей европеоидов является гетерозиготным носителем аллеля гена муковисцидоза. Частота среди новорожденных – 1:2000. Ежегодно рождается около 3500 детей с этим тяжелым, часто ведущим к летальному исходу заболеванием. В последнее время удельный вес этих больных в популяциях возрастает. Дефект гена определен множеством вариантов мутаций, одна из которых возникает в результате делеции трех нуклеотидов и приводит к утрате одной аминокислоты в регуляторном трансмембранном белке. Муковисцидоз проявляется в кишечной форме, легочной и смешанной.

Гиперхолестеринемия

Это заболевание связано с нарушением обмена холестерина. Избыток холестерина откладывается на стенках сосудов в виде атеросклеротических бляшек, что приводит к развитию ишемической болезни.

Холестерин необходим нашему организму. Он является компонентом клеточных мембран, на его основе синтезируются стероидные гормоны, желчные кислоты. В среднем 1000 мг холестерина синтезируется у человека в клетках печени в сутки, а 500 мг поступает с животной пищей. Но при нарушениях холестеринового обмена типа гиперхолестеринемии в кровеносных сосудах накапливается избыток холестерина, приводя к атеросклерозу. Наследование мультифакториальное.

Фенилкетонурия

Заболевание вызывает нарушение высшей нервной деятельности. Тип наследования заболевания - аутосомно-рецессивное. Частота встречаемости среди новорожденных – 1:10000, частота носителей патологического аллеля гена – 1:50.

Обусловлено разными мутациями в гене, контролирующем метаболизм аминокислоты фенилаланина. При мутации гена фенилаланин превращается не в тирозин, а в фенилпировиноградную кислоту. В результате нарушается миелинизация нейронов головного мозга, что приводит к слабоумию, микроцефалии. При своевременном выявлении этого заболевания и назначении диеты с

пониженным содержанием фенилаланина симптомы патологии значительно ослабляются.

Гемоглинопатии

Вызывают нарушение структуры гемоглобина. В результате измененный гемоглобин не может нормально выполнять свои функции (переносчика O_2 , CO_2). К формам гемоглинопатий относятся талассемия, серповидно-клеточная анемия. Тип наследования заболевания – аутосомно-рецессивный.

Известно, что в состав молекулы гемоглобина человека входят две α -цепи и две β -цепи. α – цепь закодирована геном, локализованным в 16 паре хромосом, β -цепь закодирована геном, локализованным в 11 паре хромосом. В состав α -цепи входит 146 аминокислот, при этом в норме шестое положение занимает глутаминовая кислота (закодирована триплетом ГАА). При участии нормальной α -цепи образуется нормальный гемоглобин – **HbA**. В участке ДНК, кодирующего α -цепь, в результате мутации происходит замена триплета ГАА на триплет ГТА, и тогда на месте глутаминовой кислоты в молекуле гемоглобина появится валин, в соответствии с генетическим кодом.

нормальный гемоглобин HbA: ...вал-гис-лей-тре-про-глу-глу-лиз-...

измененный гемоглобин HbS: ...вал-гис-лей-тре-про-вал-глу-лиз-...

В итоге вместо гемоглобина **HbA** появится новый гемоглобин – **HbS**. То есть замена всего лишь одного нуклеотида и одной аминокислоты приводит к развитию тяжелого заболевания – серповидно-клеточной анемии. Патология в полной мере проявляется у гомозигот.

На клеточном уровне эта болезнь проявляется в том, что эритроциты приобретают форму серпа и теряют способность к нормальному транспорту кислорода (рис. 34).

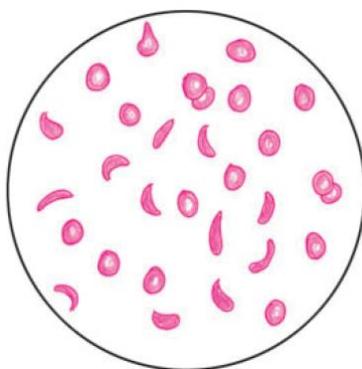


Рис. 34. Нормальные и измененные эритроциты в крови больного серповидно-клеточной анемией.

Гомозиготы HbS/HbS умирают в раннем детстве, гетерозиготы HbA/HbS характеризуются слабо измененными эритроцитами. HbS не употребляют малярийные плазмодии, поэтому изменение гемоглобина значительно повышает устойчивость лиц с гетерозиготным генотипом к малярии. В регионах Земли, где распространена малярия (например, в Африке), селективный отбор действовал в пользу гетерозигот и эта мутация чаще встречалась. Таким образом, серповидноклеточная анемия – это пример относительности «полезности» и «вредности» мутаций.

Известны десятки молекулярно-генетических причин, ведущих к нарушению структуры гемоглобина: точковые мутации, делеции, нарушения процессинга мРНК. В странах Южной Европы широко распространены гемоглобинопатии под общим названием талассемия. Различают легкие и тяжелые формы этих заболеваний.

Самостоятельная работа

Задание 1.

Фрагмент ДНК имеет следующую последовательность:

3'ТЦЦААТГЦЦТГАСГ5'

Подберите праймеры для ПЦР этого фрагмента.

Задание 2.

Фрагмент ДНК имеет следующую последовательность:

5'ТЦЦААТГЦЦГГТГАЦГ3'

Какая из рестриктаз HindIII (сайт A/АГЦТТ), MSPI (сайт ЦЦ/ГГ), RSAI (сайт ГТ/АЦ) будет разрезать ее на фрагменты длиной 9 пн и 7 пн?

Ответы на задания

Задание 1. 5' АГТТТА 3' и 5' ГЦАГТС 3'

Задание 2. MSPI

МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПАТОЛОГИЯ ПЛОДА

Медико-генетическое консультирование – это профессиональная оценка риска наследственных и врожденных болезней у членов семьи. Медико-генетическое консультирование призвано избавить человечество от страданий, связанных с наследственными (генетическими) заболеваниями. Главные цели медико-генетического консультирования заключаются в установлении роли генотипа в развитии данного заболевания и прогнозировании риска рождения больных потомков. Рекомендации, даваемые в медико-генетических консультациях в отношении заключения брака или прогноза генетической полноценности потомства, направлены на то, чтобы они учитывались, но решение консультируемые лица принимают добровольно.

Медико-генетическое консультирование включает 2 основных этапа:

А) *Уточнение диагноза.*

Для этой цели используют генеалогический, цитогенетический, биохимический молекулярно-генетический методы исследования, которым подвергаются пробанд и его родственники. Точный клинический и генетический диагноз заболевания позволяет установить степень генетического риска и выбор эффективных методов пренатальной диагностики и профилактического лечения.

Б) *Прогноз потомства.*

Сущность генетического прогноза заключается в определении вероятности появления наследственной патологии в семье. Генетический риск может быть определен либо путем теоретических расчетов, либо с помощью эмпирических данных.

Виды медико-генетического консультирования:

- Проспективное консультирование - когда семья только планирует рождение первенца - лучшее время для медико-генетического консультирования.
- Ретроспективное консультирование – медико-генетическое консультирование семей, где ранее уже отмечалось рождение ребенка с наследственной или врожденной патологией.
 - Консультирование во время беременности.
 - Добрачное консультирование – до вступления в брак.

В распоряжении врачей России имеется весь арсенал перечисленных выше видов медико-генетического консультирования. Наиболее эффективным является проспективное консультирование, когда риск рождения больного ребенка определяется до наступления или в ранние сроки беременности. Проспективное консультирование часто проводят в случае кровного родства супругов, при отягощенной наследственности, при воздействии мутагенных факторов среды на супругов незадолго до наступления беременности, а также до рождения ребенка. Наиболее часты обращения для консультирования во время беременности и для пренатальной диагностики.

Расчет риска наследственного заболевания может осложниться при пониженной экспрессивности или неполной пенетрантности гена, позднем проявлении генетической аномалии, полигенном характере наследования заболевания.

Пренатальная диагностика – это диагностика врожденной и наследственной патологии плода на этапе внутриутробного развития. Основные показания для направления беременной женщины на пренатальную диагностику:

1. Возраст старше 35 лет
2. Наличие не менее двух самопроизвольных аборт на ранних сроках беременности
3. Рождение в семье ребенка от предыдущей беременности с наследственным заболеванием или врожденным уродством
4. Перенесенные вирусные инфекции и паразитозы (гепатит, краснуха, токсоплазмоз и др.)
5. Облучение до зачатия
6. Моногенные наследственные заболевания у кровных родственников
7. Применение до зачатия или во время беременности лекарственных препаратов.

Для проведения пренатальной диагностики необходим отбор материала для исследований. Используют следующие способы (под контролем УЗИ):

- хорионбиопсию на 8-й неделе беременности (биопсия клеток ворсин хориона);
- плацентобиопсия на 12-й неделе (клетки плаценты).
- амниоцентез на 15-18-й неделе (амниотическая жидкость).
- кордоцентез на 18-22-й неделе (из кровеносных сосудов пуповины).

Хорионбиопсия и плацентобиопсия позволяют производить наиболее раннюю диагностику, но риск осложнений достигает 3%. Кордоцентез производится слишком поздно, что затрудняет повторные исследования в случае сомнений. Поэтому среди методов, позволяющих диагностировать заболевание до рождения ребенка, ведущее место занимает амниоцентез – получение амниотической жидкости и клеток плода с помощью прокола плодного пузыря (рис. 35).

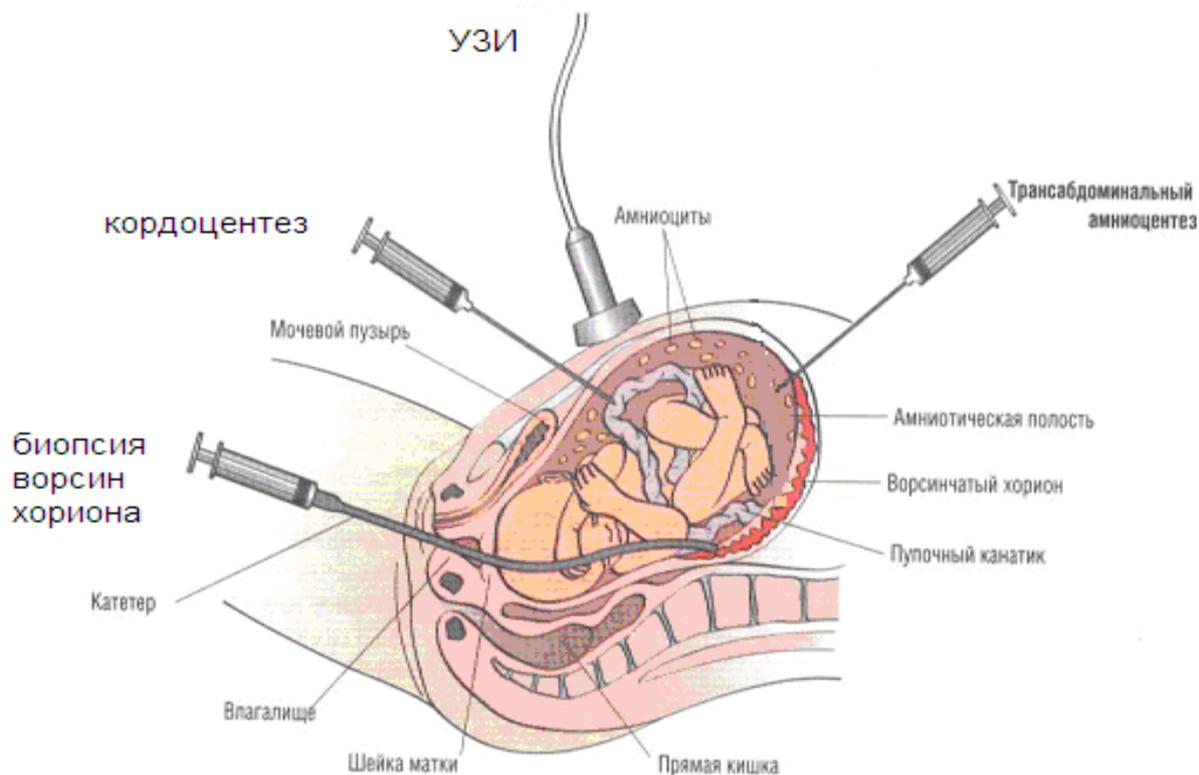


Рис. 35. Способы получения материала для исследований.

Этим методом диагностируют многие хромосомные болезни и некоторые заболевания, в основе которых лежат генные мутации. Риск осложнений относительно невелик – примерно 0,2%.

Изучение клеточного материала развивающегося плода возможно цитогенетическим, биохимическим, иммуногенетическим, молекулярно-генетическим, методами генетики соматических клеток.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ:

1. КАКИМ МЕТОДОМ МОЖНО ВЫЯВИТЬ ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКА В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ?

- 1) генеалогическим;
- 2) цитогенетическим;
- 3) близнецовым;
- 4) биохимическим.

2. С ПОМОЩЬЮ КАКОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЯЕТСЯ РОЛЬ ГЕНОТИПА И СРЕДЫ В РАЗВИТИИ ПРИЗНАКА?

- 1) генеалогического;
- 2) близнецового;
- 3) цитогенетического;
- 4) гибридологического.

3. ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ ИЗУЧАЮТ, ИСПОЛЬЗУЯ МЕТОД

- 1) генеалогический;
- 2) цитогенетический;
- 3) близнецовый;
- 4) гибридологический.

4. КАКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОБУСЛОВЛИВАЕТ РАЗВИТИЕ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ?

- 1) генная;
- 2) хромосомная;
- 3) модификационная;
- 4) случайная.

5. С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕЛЬЦА БАРА МОЖНО ВЫЯСНИТЬ

- 1) характер изменения генов;
- 2) закономерности наследования признаков у человека;
- 3) пол человека;
- 4) характер изменения структуры хромосом.

6. МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ ЧЕЛОВЕКА, В ОСНОВЕ КОТОРОГО ЛЕЖИТ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧИСЛА ХРОМОСОМ, ОСОБЕННОСТЕЙ ИХ СТРОЕНИЯ, НАЗЫВАЮТ

- 1) генеалогическим;
- 2) близнецовым;
- 3) гибридологическим;
- 4) цитогенетическим.

7. БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЗВОЛЯЕТ ДИАГНОСТИРОВАТЬ:

- 1) болезни, обусловленные генными мутациями;
- 2) болезни, обусловленные хромосомными абберациями;
- 3) болезни, обусловленные изменениями числа аутомсомных хромосом в кариотипе;
- 4) болезни, обусловленные нерасхождением X-половых хромосом.

8. ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЖНОГО РИСУНКА ПАЛЬЦЕВ, ЛАДОНЕЙ, СТОП ПРИМЕНЯЕТСЯ МЕТОД:

- 1) генеалогический;
- 2) биохимический;
- 3) цитогенетический;
- 4) дерматоглифический.

9. МЕТОД ПЦР В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ:

- 1) определения группы крови;
- 2) определения мутаций генов;
- 3) выявления пола особи;
- 4) диагностики хромосомных болезней, обусловленных аномалиями аутомсом.

10. ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЗВОЛЯЕТ:

- 1) определить частоты доминантных, рецессивных аллелей и частоту гетерозиготного носительства мутантного гена в популяции;
- 2) определить зависимость развития признака от наследственных и средовых факторов;
- 3) изучать кожный рисунок;
- 4) проводить исследование хромосом.

11. В ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЛЕЖИТ ИЗУЧЕНИЕ:

- 1) структуры хромосом;
- 2) числа хромосом в кариотипе;
- 3) структуры ДНК;
- 4) влияния среды на развитие признака.

12. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК – ЭТО:

- 1) определение нуклеотидной последовательности;
- 2) копирование небольшого интересующего фрагмента ДНК;
- 3) микроскопическое исследование хромосом;
- 4) исследование полового хроматина.

Ответы на тесты

№ вопроса	Ответ	№ вопроса	Ответ	№ вопроса	Ответ
1	1	5	3	9	2
2	2	6	4	10	1
3	2	7	1	11	3
4	1	8	4	12	1

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Биология / Под ред. Н.В.Чебышева. – М.: Высшая школа, 2011. – 546с.
2. Биология. Кн.1: [Эволюция. Экосистема. Биосфера. Человечество].- Васильева В.И., Волков И.Н., Ярыгин В.Н., Синельщикова В.В. Изд.: Высшая школа, 2010. – 462с.
3. Биология. Кн.2: [Жизнь. Гены. Клетка. Онтогенез. Человек].-Васильева В.И., Волков И.Н., Ярыгин В.Н., Синельщикова В.В. Изд.: Высшая школа, 2010. – 462с.
4. Биология: учебное пособие для ст-тов мед. ВУЗов \ Викторова Т.В., Асанов А.Ю., М., «Академия», 2011. – 289с.
5. Лекции по биологии Часть 1. Цитология и генетика \ Под ред. Т.В.Викторовой. – Уфа, БГМУ, 2008. – 189 с., илл.

Дополнительная:

1. Ньюсбаум Р.Л., Мак-Иннес Р.Р., Виллард Х.Ф. Медицинская генетика. пер. с англ А.Ш. Латыпова; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.
2. МакКонки Э. Геном человека. – М.: Техносфера, 2011. – 288 с.
3. Периодические издания (журналы):
 - ✓ Генетика
 - ✓ Медицинская генетика

Лукманова Гульнур Ишмурзовна,
Измайлова Светлана Михайловна,
Мусыргалина Фарзана Фаритовна,
Данилко Ксения Владимировна,
Исхакова Гульназ Минулловна,
Куватова Дильбар Нурвилевна,
Волкова Альфия Талховна,
Викторова Татьяна Викторовна

Методы антропогенетики

Учебное пособие

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано к печати 27.11.2015 г.

Отпечатано на цифровой аппаратуре

с готового оригинал-макета, представленного авторами.

Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 4,3.

Тираж 209 экз. Заказ № 42

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,

Тел.: (347) 272-86-31

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России