

МЗ РФ ВГМУ
2 высшее образование

**«Биохимический метод
изучения генетики
человека»**

**Выполнила: д.м.н., проф. Каредина В.
С.**

Методы изучения генетики человека

- Клинико – генеалогический
- Близнецовый
- Популяционно – статистический
- Цитогенетический
- Метод генетики соматических клеток
- Биохимический метод
- Молекулярно – генетические
- Метод приемных детей
- Антропометрический
- Дерматоглифика

- **Биохимический метод.**

- Заключается в определении в крови или моче активности ферментов или содержания продуктов метаболизма.
- С его помощью выявляют нарушения в обмене веществ, возникающие при различных патологических состояниях.

Биохимические показатели отражают сущность наследственной болезни точнее, чем клиническая симптоматика.

При биохимической диагностике оценивается фенотип организма на молекулярном уровне, а наследственная болезнь в конечном счете и есть фенотип.

Поэтому биохимическим методам принадлежит ведущая роль в диагностике многих моногенных болезней. Однако сложность диагностики заключается в том, что сотни наследственных болезней по некоторым биохимическим показателям мочи или крови могут быть сходными (например, ацидоз, протеинурия и т.д.).

- Определять для каждого больного многие метаболиты очень трудоемко и дорого. Знание общих характеристик изменений обмена веществ при разных наследственных болезнях позволило по-новому построить исходную схему обследования, исходя из клинической картины болезни, генеалогических сведений и плана биохимического анализа. Такой подход позволяет проводить обследование на основе поэтапного исключения определенных классов болезней (просеивающие методы).

- **В биохимической диагностике наследственных болезней используются:**
- **классические биохимические методы:**
 - электрофорез,
 - хроматография,
 - спектроскопия,
- **современные высокоточные технологии:**
 - жидкостная хроматография,
 - масс-спектрометрия,
 - магнитно-резонансная спектрометрия,
 - бомбардировка быстрыми нейтронами.

- При гибридизации соматических клеток двух разных линий образуются гетерокарионы — клетки, которые содержат оба родительских ядра. Затем в результате митоза и деления образуются две одноядерные клетки — синкарионы, имеющие хромосомы обоих родительских клеток.
- В течение первых делений гибридной клетки, не ясно почему, происходит потеря хромосом одного из видов. Так, у гибридов мышь-хомячок элиминируются хромосомы мыши.

- Биохимическое обследование пациента позволяет идентифицировать любые метаболиты, специфические для той наследственной болезни, с подозрением на которую он был направлен. Каждое обследование должно начинаться с составления плана, в основе которого лежит клинико-генетическая информация о пациенте и его семье. **«Объектами»** биохимической диагностики являются биологические жидкости:
 - моча, пот, плазма, сыворотка крови,
 - эритроциты, лейкоциты, культуры фибробластов, лимфоцитов.

- Практически во всех случаях биохимическая диагностика начинается с *просеивающего* подхода, в котором выделяют два уровня:
- первичный
- уточняющий.
- Каждый из этих уровней может быть более или менее полным в зависимости от оснащённости лаборатории.
- Основная цель первичного уровня диагностики заключается в том, чтобы исключить здоровых индивидов из дальнейшего обследования. Различают два вида программ первичной биохимической диагностики: *массовые* и *селективные*. На первом этапе в таких программах используются моча и кровь.

- **Существуют массовые просеивающие программы диагностики** среди новорожденных фенилкетонурии, врожденного гипотиреоза, врожденной гиперплазии надпочечников, муковисцидоза, галактоземии. Биологическим материалом для диагностики является кровь. Высушенные капли капиллярной крови новорожденных на хроматографической или фильтровальной бумаге пересылают из родильных домов в лабораторию (можно по почте). Материал должен поступить в лабораторию в течение двух—трех дней после взятия пробы.

- Для диагностики *фенилкетонурии* кровь новорожденных берут в родильном доме на 3—5-й день после рождения. Если кровь будет взята раньше, то возможны ложноположительные результаты. В лаборатории в пятнах крови определяют количество фенилаланина с помощью любого из следующих методов:
 - микробиологический тест Гатри,
 - флуорометрия,
 - распределительная хроматография на бумаге,
 - тонкослойная хроматография.

- Между методами нет принципиальной разницы, поэтому каждая лаборатория выбирает более подходящий для ее условий метод. Опыт показал, что пропущенные случаи фенилкетонурии являются не ошибками лабораторных исследований, а следствием недобросовестности или небрежности в работе медицинских сестер при взятии крови в родильных домах. В случае положительного результата на фенилкетонурию проводится уточняющая биохимическая диагностика путем количественного определения фенилаланина в крови.

- Врожденный *гипотиреоз* (снижение функции щитовидной железы) может быть обусловлен разными причинами: агенезия щитовидной железы; эктопия щитовидной железы; наследственные формы дисгормоногенеза; аутоиммунные процессы. Клинически врожденный гипотиреоз проявляется задержкой умственного развития, резким отставанием в росте, отечностью кожных покровов, развитием зоба.

- Программа массовой диагностики врожденного *гипотиреоза* одинакова для всех форм. Суть ее сводится к тому, чтобы в крови ребенка после 3-го дня жизни проверить, нет ли снижения уровня тироксина (гормона щитовидной железы) в плазме крови и увеличено ли содержание тиреоид-стимулирующего гормона — тиреотропного гормона гипофиза. В практике применяется два метода просеивающей диагностики:
 - радиоиммунный,
 - иммуноферментный (иммунофлуоресцентный).

Чувствительность и специфичность их примерно одинакова. По техническим причинам (не требуется условий для работы с радиоактивными веществами) иммуноферментный метод предпочтительнее, хотя он дороже. Тироксин и тиреоидстимулирующий гормон определяют в образцах крови новорожденных, предварительно высушенных на специальной фильтровальной бумаге. При положительном ответе просеивающего метода диагноз гипотиреоза обязательно должен быть подтвержден в клинических условиях эндокринологом и лабораторным анализом гормонов щитовидной железы в сыворотке крови.

■ Просеивающие программы массовой диагностики наследственных болезней применяются не только среди новорожденных. Они могут быть организованы для выявления тех болезней, которые распространены в каких-либо группах населения или популяциях. Например, среди евреев-ашкенази отмечается высокая частота тяжелого заболевания Тей—Сакса. В США организована просеивающая биохимическая программа по выявлению гетерозиготности по этому заболеванию с последующим медико-генетическим консультированием таких семей..

- На Кипре и в Италии (Сицилия) с высокой частотой встречается тяжелое заболевание крови — **талассемия** (гемоглобинопатия). Органы здравоохранения этих стран организовали биохимическое просеивание населения для выявления скрытых носителей талассемии (гетерозигот), для которых было обеспечено в последующем медико-генетическое консультирование и пренатальная диагностика.

- ***Селективные диагностические программы предусматривают проверку*** биохимических аномалий обмена (моча, кровь) у пациентов, у которых подозреваются генные наследственные болезни.
- Фактически такие программы должны «функционировать» в каждой большой больнице. Показания для их применения достаточно широкие, стоимость каждого анализа невысокая.

- В селективных программах могут использоваться простые качественные реакции (например, тест с хлоридом железа для выявления фенилкетонурии или с динитрофенилгидрозином для выявления кетокислот) или более точные методы, позволяющие обнаруживать большие группы отклонений. Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать наследственные нарушения обмена аминокислот, олигосахаридов и гликозаминогликанов (мукополисахаридов).

- Газовая хроматография применяется для выявления наследственных болезней обмена органических кислот. С помощью электрофореза гемоглобинов диагностируется вся группа гемоглобинопатии.
- Нередко приходится углублять биохимический анализ — от количественного определения метаболита до определения активности фермента (использование нативных тканей или культивированных клеток), например, с помощью флюорометрических методик.

- В современных условиях очень многие этапы биохимической диагностики осуществляются автоматическими приборами (с аминоканализаторами).
- Реальным примером программы селективного скрининга на наследственные болезни обмена веществ с острым течением и ранним летальным исходом является программа, разработанная Н. В. Журковой в Медико-генетическом научном центре РАМН.

- ***Первый этап*** программы включает качественный и количественный анализ мочи и крови (14 тестов):
 - на белок, на кетокислоты,
 - на цистин и гомоцистин,
 - креатинин, ионы аммония и др.
- ***Второй этап*** основан на методах тонкослойной хроматографии мочи и крови для выявления:
 - аминокислот,
 - фенольных кислот,
 - моно- и дисахаридов и других соединений.



- С помощью электрофореза мочи выявляют гликозаминогликаны. Эта программа позволяет выявлять 140 наследственных болезней обмена веществ у детей из следующих основных классов:
 - аминокацидопатии;
 - органические ацидурии;
 - лизосомные болезни накопления;
 - болезни углеводного обмена;
 - болезни обмена металлов;
 - болезни пуринового и пиримидинового обмена;

- наследственные болезни метаболического транспорта;
- наследственные болезни желудочно-кишечного тракта;
- наследственные болезни нейротрансмиттерного обмена;
- наследственные болезни обмена витаминов;
- митохондриальные болезни;
- болезни β -окисления жирных кислот;
- пероксисомные болезни.

- Важность такой программы в детских больницах трудно переоценить.
- **Показаниями для применения биохимических методов диагностики у новорожденных** являются такие симптомы, как:
 - судороги, кома, рвота, гипотония, желтуха,
 - специфический запах мочи и пота,
 - ацидоз, нарушенное кислотно-основное равновесие, остановка роста
 - нарушение физического развития
 - непереносимость некоторых продуктов, лекарств

- У детей биохимические методы используются во всех случаях при подозрении на наследственные болезни обмена веществ (задержка физического и умственного развития, потеря приобретенных функций, специфическая для какой-либо наследственной болезни клиническая картина).

- Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать нарушение обмена аминокислот, олигосахаридов, мукополисахаридов.
- Газовая хроматография применяется для выявления нарушений обмена органических кислот и т.д.

- • Биохимические методы применяются и для диагностики гетерозиготных состояний у взрослых. Известно, что среди здоровых людей всегда имеется большое число так называемых носителей патологического гена (гетерозиготное носительство). Хотя такие люди внешне здоровы, вероятность появления заболевания у их ребенка всегда существует.
- В связи с этим, **выявление гетерозиготного** носительства — важная задача медицинской генетики.

- Понятно, что если в брак вступают гетерозиготные носители какого-либо заболевания, то риск рождения больного ребенка в такой семье составит 25%.
- Шансы на встречу двух носителей одинакового патологического гена выше, если в брак вступают родственники, т.к. они могут унаследовать один и тот же рецессивный ген от своего общего предка.

- Предположить гетерозиготное носительство у женщины можно, если:
- ее отец поражен наследственной¹ болезнью;
- у женщины родились больные сыновья;
- женщина имеет больного брата или братьев;
- у двух дочерей женщины родились больные сыновья (или сын);
- у здоровых родителей родился больной сын, а у матери в родословной есть больные мужчины.

- Выявление гетерозиготных носителей того или иного заболевания возможно путем использования биохимических тестов (прием фенилаланина для выявления фенилкетонурии, прием сахара — сахарного диабета и.т.д.), микроскопического исследования клеток крови и тканей, определения активности фермента, измененного в результате мутации.

- Известно, что заболевания, в основе которых лежит нарушение обмена веществ, составляют значительную часть наследственной патологии (фенилкетонурия, галактоземия, алкаптонурия, альбинизм и др.). Так, гетерозиготные носители фенилкетонурии реагируют на введение фенилаланина более сильным повышением содержания аминокислоты в плазме, чем нормальные гомозиготы (болезнь обусловлена рецессивным аллелем).

- Биохимический метод широко применяется в медико-генетическом консультировании для определения риска рождения больного ребенка. Успехи в области биохимической генетики способствуют более широкому внедрению диагностики гетерозиготного носительства в практику. Еще недавно можно было диагностировать не более 10-15 гетерозиготных состояний, в настоящее время — более 200. Однако следует отметить, что до сих пор имеется немало наследственных заболеваний, для которых методы гетерозиготной диагностики еще не разработаны.

