МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Супрун Е.В., Крижна С.І., Березнякова М.Є., Литвинова О.М., Ковальова В.І., Козар В.В., ЛитвиненкоГ.Л.

**МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ**

**СПАДКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

Методичні рекомендації

для аудиторної роботи студентів

*За редакцією проф. Е.В. Супрун*

Харків

Видавництво НФаУ

2016

УДК:

*Рекомендовано ЦМК Національного фармацевтичного*

*університету (протокол № від 2016 р.)*

**Рецензент:** д-р. мед. наук, проф.. Ткач Ю.І. зав. каф. клінічної. лабораторної діагностики Харківської академії післядипломної освіти

**Супрун Е.В., Крижна С.І., Березнякова М.Є., Литвинова О.М.,**

**Ковальова В.І., Козар В.В., ЛитвиненкоГ.Л.**

Методи лабораторної діагностики спадкових хвороб: метод. рек. для аудит. роботи студентів / за ред.. проф. Е.В. Супрун. Х. : НФаУ, 2016. 22 с.

Призначено для студентів спеціальності «Лабораторна діагностика», може бути використана студентами медичних та педагогічних інститутів, викладачами медичних училищ, вчителями середніх шкіл з поглибленим викладанням біології.

У виданні викладено матеріал щодо методів цитогенетичного та генеалогічного аналізів, які застосовуються для встановлення каріотипу людини в нормі та при різних патологічних станах та при вивченні спадковості людини шляхом аналізу родоводів.

**УДК**

Супрун Е.В., Крижна С.І., Березнякова М.Є., Литвинова О.М., Ковальова В.І., Козар В.В., ЛитвиненкоГ.Л. 2016

НФаУ, 2016

**ЗМІСТ**

**Вступ** 4

**1. Цитологічні та цитогенетичні методи діагностики** 5

1.1. Показання до цитогенетичного дослідження 5

1.2. Підготовка до постановки культури. Забір та зберігання крові 6

1.3. Умови культивування лімфоцитів периферичної крові людини 6

1.4. Класичний метод культури лімфоцитів периферичної крові людини та технологія приготування хромосомних препаратів 7

1.5. Техніка методу 7

**2. Культивування клітин амніотичної рідини та технологія приготування хромосомних препаратів** 8

**3. Методи забарвлення хромосом**  9

3.1. Рутинний метод 9

3.2. Диференційний метод забарвлення хромосом 9

**4. Номенклатура хромосом нормального каріотипу людини** 10

**5. Дослідження статевого Х-хроматину** 11

**6.** **Генеалогічний метод дослідження** 13

6.1. Задачі 16

6.2. Відповіді 17

**7. Список використаних джерел** 19

**8. Додатки** 20

**ВСТУП**

Підготовка фахівців зі спеціальності "Лабораторна діагностика" розпочата в Національному фармацевтичному університеті у 2001 році. З вересня 2012 вперше в Україні серед медичних та фармацевтичних вузів почалась підготовка лікарів-лаборантів з освітньо-кваліфікаційним рівнем «магістр» спеціальності «Лабораторна діагностика», напрямок «Медицина».

Останні відкриття в медичній генетиці значно розширили можливість профілактики та лікування спадкових захворювань. Найбільш важкою та складною задачею сучасної медичної генетики є розробка та впровадження в практику методів діагностики спадкових захворювань.

Всі спадкові захворювання з генетичної точки зору можуть бути поділені на дві великі групи: генні та хромосомні. До генних відносяться захворювання, які виникають у результаті мутацій того чи іншого гену, який контролює синтез білка (структурного або ферменту) або приймає участь у обміні речовин. В залежності від кількості залучених у мутаційний процес локусів, хвороби можуть бути моногенними та полігенними. Як правило, полігенні хвороби – це хвороби зі спадковою схильністю.

Хромосомні хвороби поділяють в залежності від типу мутацій на хвороби, які обумовлені числовими аномаліями (поліплоїдії, анеуплоїдії) та структурними перебудовами (делеції, інверсії, транслокації, дуплікації). Якщо мутації виникають у зародкових клітинах, то захворювання проявляється у повній формі, а якщо нерозходження хромосом або структурна аберація виникла на ранніх стадіях ділення зиготи, то розвиваються мозаїчні форми.

Складність діагностики спадкових захворювань пов’язана з високим поліморфізмом хромосомної патології. Так, клінічні ознаки та симптоми спадкових хвороб можуть широко варіювати в залежності від особливостей генних мутацій, експресивності та пенетрантності гену, впливу факторів зовнішнього середовища. Навіть у межах однієї нозологічної форми спостерігається різний ступінь важкості перебігу одних і тих же захворювань – від стертих до важких клінічних форм. Особливості клінічного перебігу більшості захворювань обумовлює проведення додаткових методів обстеження, щодо визначення певного діагнозу.

**I. ЦИТОЛОГІЧНІ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ**

Серед методів лабораторної діагностики спадкових хвороб людини хромосомний аналіз займає особливе місце. У останнє десятиріччя з’явились принципово інші підходи до вивчення хромосом людини. Сьогодні застосовують більш досконалі методи фарбування хромосом, що дозволяють діагностувати такі глибокі дефекти структури хромосом, які раніше неможливо було визначити. У теперішній час область застосування хромосомного аналізу необмежена лише саме діагностикою хромосомних захворювань. Так, цитогенетичні методи дослідження досить широко використовуються і у клінічній практиці, особливо при медично – генетичному консультуванні.

**1.1 ПОКАЗАННЯ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ**

На хромосомний аналіз направляються:

1) пацієнти з множинними вадами розвитку;

3) пацієнти з недиференційованими формами олігофренії;

4) пацієнти з порушенням статевого диференціювання, з аномальним Х та У-хроматином;

5) жінки з безпліддям, первинною та вторинною аменореєю;

6) членів родини жінок зі звичними викиднями.

Існують **прямі та непрямі** методи дослідження хромосом.

**Прямі методи** використовують при дослідженні клітин кісткового мозку, лімфатичних вузлів, селезінки, ембріональних клітин, пухлин, мейотичних клітин статевих залоз. Прямий метод дозволяє аналізувати препарати хромосом через кілька годин після забору матеріалу.

**Непрямі методи** дослідження передбачають попереднє культивування в поживному середовищі клітин, отриманих із організму (лімфоцити периферичної крові, клітини амніотичної рідини, клітини, отримані із біоптату шкіри, клітини із різних тканин абортованих ембріонів, клітини ворсинчастого хоріону).

**1.2 ПІДГОТОВКА ДО ПОСТАНОВКИ КУЛЬТУРИ КЛІТИН. ЗАБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ КРОВІ**

Кров із вени беруть стерильним шприцем,потім переносять у стерильну пробірку, що містить 0,5 мл робочого розчину гепарину. Кров може зберігатися у холодильнику до 5 діб, але кожна доба зберігання, зменшує відсоток клітин у культурі, які діляться. Краще зберігати не кров, а плазму з лейкоцитами. Гепаринизовані зразки крові можуть транспортуватися до віддаленого центру з генетичної діагностики, але температура при цьому не повинна бути нижче +40С або вище +380С.

**1.3** **УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ**

Фіксацію культури для приготування препаратів хромосом можна здійснювати на 48-й або 72-й годині культивування. Оптимальною температурою для культивування вважається +370С. При підвищенні температури культивування до +39-400С спостерігається підвищення мітотичної активності у 3 – 4 рази, а пік мітозів зміщується на 41 – 44 годину культивування. Доцільно зберігати частину крові у холодильнику, щоб мати змогу, у випадку необхідності, можливість повторного культивування для отримання хромосомних препаратів, а також постановки декількох культур від одного пацієнта та їхньої фіксації у різний час. Для поліпшення росту клітин можна рекомендувати легке трусіння культури 1 раз на добу. Якщо у день закінчення культивування фіксацію неможливо здійснити по технічним причинам, то на 48-й або 72 годині культивування можливо поставити культуру в холодильник та зберігати її при температурі +40С до 3 діб. Процес фіксації та приготування препаратів можна при необхідності зупинити, а суспензію клітин у фіксаторі зберігати у холодильнику 1 – 2 доби.

**1.4 КЛАСИЧНИЙ МЕТОД КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ТА ТЕХНОЛОГІЯ ПРИГОТУВАННЯ ХРОМОСОМНИХ ПРЕПАРАТІВ**

**Матеріал:** 1 – 2 мл периферичної крові людини.

**Обладнання, посуд:** ламінарний бокс, термостат, виставлений на температуру +370С; центрифуга для пробірок на 1000 обертів за хвилину; флакони одноразові або шприци для забору крові; флакони для культивування (пеніцилінові флакони з гумовою пробкою або одноразові стерильні флакони); шприци одноразові на 1 мл для забору крові та на 5 мл для внесення поживного середовища у флакони; шприци одноразові на 1 мл для забору фітогемаглютинину (ФГА) у центрифужні пробірки; штативи; скляночки для розчинів NaCl і фіксатора; піпетка для розкапування культури; предметне скло з полем та інше.

**Реактиви, розчини:** розчин гепарину, розведений 0,9% розчином NaCl (1:10); поживне середовище (RPMI, 199, DMEM, F10 від різних виробників, бажано таких визнаних фірм, як «Gibco», «Sigma», «Merck», «Fluka», «Панэко»); сироватка ембріональна; ФГА одного з виробників («Gibco», «Sigma», «Merck», «Fluka», «Панэко»); колхіцин; розчин КСІ; спирт метиловий або етиловий; крижана оцтова кислота.

**1.5 ТЕХНІКА МЕТОДУ**

**Перший етап:** розлити у флакони по 5 мл поживного середовища у 2 флакони на кожного пацієнта, додати у флакони по 0,5 мл сироватки і 0,1 мл ФГА, потім додати по 0,5 мл крові пацієнта і обережно перемішати. Поставити флакони у термостат при t +370С на 72 години. На 70-й годині культивування у кожний флакон додати по 0,3 мл розчину колхіцину (у кінцевій концентрації 10 мкг/мл) за 2 години до відбору готової суміші для подальшого дослідження).

**Другий етап.** Відцентригувати пробірки протягом 5 – 7 хвилин, злити надосадову рідину, обережно збовтати осад, додати гіпотонічний розчин, попередньо підігріти до температури +370С, експозиція в гіпотонічному розчині становить – 7 хвилин, потім знову відцентригувати пробірки 10 хвилин, злити надосадову рідину, розмішати і додати фіксуючу суміш на 30 хвилин, знову відцентригувати протягом 10 хвилин; процедуру повторити 3 рази, поки суміш не стане прозорою.

**Третій етап:** розкапування. Клітинну суспензію наносять дозатором (на висоті піднятої вгору руки) на мокре охолоджене предметне скло і висушують над полум’ям горілки. Наступного дня після висихання предметне скло можна фарбувати, застосовуючи той варіант фабування, який передбачено для постановки діагнозу.

**II. КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН АМНІОТИЧНОЇ РІДИНИ ТА ТЕХНОЛОГІЯ ПРИГОТУВАННЯ ХРОМОСОМНИХ ПРЕПАРАТІВ**

**Матеріал:** 15 – 30 мл амніотичної рідини набрати в один – два стерильні флакони, транспортувати при кімнатній температурі. До постановки культури амніотичну рідину можна зберігати до двох діб при t +40С.

**Обладнання, посуд** – ті ж, що й при попередньому методі, додатково необхідно мати СО2-термостат, виставлений на температуру +370С, інвертований мікроскоп, флакони для культивування амніотичної рідини (флакони Карреля, пробірки Лейтона).

**Реактиви** – такі ж, але додатково необхідно мати розчин Версена, поживне середовище (можна застосовувати ті ж, що й для культивування лімфоцитів периферичної крові, але й також спеціальні – "Amnio max", "Amnio Grow" фірми «Gibco»).

**Техніка методу**: амніотичну рідину розлити в 2 – 3 стерильні центрифужні пробірки і відцентригувати 5 хвилин. Відібрати надосадову рідину, залишити 1,5 мл амніотичної рідини з осадом клітин, ретельно розбовтати, потім перенести у флакони для культивування, додати 1,5 мл поживного середовища (80% - поживного середовища і 20% - телячої ембріональної сироватки), нещільно прикрити флакони і поставити у СО2 – термостат. За допомогою інвертованого мікроскопу оцінити характер та інтенсивність прикріплення клітин у флаконах Карреля або пробірках Лейтона. Необхідно також оцінити характер та інтенсивність прикріплення клітин на динаміку формування первинних клітинних ліній.

Наступним етапом є зміна поживного середовища, яка здійснюється кожні 5 – 7 днів. Перша фіксація клітин проводиться в кінці 2-го – на початку 3-го тижня культивування, яку необхідно оцінити під мікроскопом (щільність колоній клітин не повинна бути високою, але добре сформованою).

Провести заміну поживного середовища на свіже перед фіксацією за 18 годин. Через 18 годин додається 0,25 мл розчину колхіцину (10 мкг/мл) на 2 години. Злити поживне середовище в центрифужну пробірку, клітини з дна культурального флакону змити розчином Версена. Обмити культуральний флакон RPMI середовищем, потім злити всю отриману суміш у центрифужну пробірку. Подальше зняття культури проводиться у такий же спосіб, як при культивуванні лімфоцитів периферичної крові.

**III. МЕТОДИ ЗАБАРВЛЕННЯ ХРОМОСОМ**

**3.1 Рутинний метод забарвлення**

**1. Забарвлення азур – еозином.** Готують 0,1% розчин азуру та 0,1% розчин еозину у дистильованій воді. Робочий розчин барвника складається з 6-ти частин азуру та 3-х частин еозину; до них додають 9 частин водопровідної води. Тривалість забарвлення становить 3 – 7 хвилини. Препарати хромосом змивають водопровідною водою та висушують. Для забарвлення можливо використовувати і готовий барвник Романовсьго – Гімза, який розводять водопровідною водою у 50 разів.

**3.2 Диференційний метод забарвлення хромосом**

Метод диференційного забарвлення хромосом дозволяє ідентифікувати кожну хромосому у каріотипі людини та навіть розрізняти в деяких випадках батьківські та материнські хромосоми завдяки специфічному забарвленню кожної хромосоми. Гомологічні хромосоми забарвлюються ідентично, за виключенням поліморфних районів, в яких локалізуються різні алельні варіанти генів. Алельний поліморфізм характерний для багатьох генів і зустрічається в більшості популяцій. Виявлення поліморфізму при цитогенетичному дослідженні не має діагностичного значення та потребує подальшого використання молекулярних методів дослідження.

**G – забарвлення:** препарати розміщують на 10 – 15 секунд у 0,25% розчин трипсину, розведеного у 0,25% розчині Хенкса при кімнатній температурі, потім проводять через серію спиртів зростаючої міцності (700, 960, 1000), висушують протягом 8 – 15 хвилин при температурі +25-270С, забарвлюють розчином азур – еозину або барвником Романовського – Гімза, розведених у 50 разів фосфатним буфером.

**Перегляд препаратів та відбір метафазних пластинок для аналізу**

Відбір метафазних пластинок проводиться при збільшенні ×140 (об’єктив ×10, окуляр, ×7). Відбирають метафазні пластинки з рівномірним розкидом, мінімальним числом накладень хромосом однієї на іншу, оптимальним ступенем спіралізації, відсутністю метафазних пластинок, які мають щільно лежати поряд. При аналізі метафазних пластинок підраховують загальне число хромосом у клітині, та кількість хромосом у групах.

**IV. НОМЕНКЛАТУРА ХРОМОСОМ НОРМАЛЬНОГО КАРІОТИПУ ЛЮДИНИ**

Згідно рішень Денверського та Лондонського міжнародних нарад, каріотип людини поділяють на 7 груп, що різняться за розміром хромосом та положенням центромери. На стандартно приготовлених рівномірно забарвлених препаратах хромосом форма їх визначається положенням первинної перетяжки, яка розділяє кожну хромосому на два плеча. В області первинної перетяжки знаходиться центромера – щільне тільце, до якого прикріплюються мікротрубочки веретена ділення під час мітозу або мейозу. В залежності від розташування первинної перетяжки і центромери, визначають хромосоми: метацентричні (центромера розташована практично посередені – обидва плеча хромосоми є рівними), субметацентричні (центромера змістилася із середнього положення – визначають коротке (р) і довге (q) плечі) і акроцентричні (центромера зміщена в кінцеве положення) (рис. 1). Групи хромосом зазначені буквами англійського алфавіту від А до G. Аутосоми мають номери від 1 до 22. Статеві хромосоми зазначені як Х та У.

Група А (1); група В (2); група С (3); група D (4); група Е (5); група F (6); G (7); (рис. 1).

До першої групи А відносять 1, 2, та 3 пари хромосом, найбільші хромосоми каріотипу. 1-а та 3-я пари – метацентричні. 1-а пара іноді має вторинну перетяжку в перицентромерному районі довгого плеча, 2-а пара – найбільший субметацентрик.

До групи В відносять хромосоми 4 і 5, які за формою представляють собою субметацентричні хромосоми та морфологічно майже не відрізняються ні за розміром, ні за положенням центромер.

До групи С відносять хромосоми з 6-ї по 12-ту та статеву Х. Переважно, це субметацентричні хромосоми великих і середніх розмірів. Найбільш великими хромосомами групи С вважають хромосоми 6 та 7 та Х. Відмінністю хромосоми 7 від хромосоми 6 є більш виражена її метацентричність. Хромосоми 8 і 9 – майже однакові за розміром. Хромосома 8 більш метацентрична, ніж хромосома 9. Хромосома 9 характеризується регулярною вторинною перетяжкою в прицентромерному районі довгого плеча.

Хромосоми 10, 11, 12 мають середні розміри та субметацентричну структуру. Ідентифікування проводять за допомогою диференційного забарвлення. Відмінністю хромосоми 11 є більш виражена метацентричність, ніж у хромосоми 12.

До групи D відносять хромосоми 13, 14, 15, які за структурою представлені акроцентричною формою, середні за розміром та з термінально розташованими центромерами. Коротке плече кожної з трьох пар хромосом потенційно може формувати супутники. Ні розмірами, ні морфологією після рутинного забарвлення ці хромосоми між собою не відрізняються.

До групи Е відносять хромосоми 16, 17, 18. Хромосома 16 відносно коротка метацентрична хромосома, 17 – відносно коротка субметацентрична хромосома. Хромосома 18 – найбільш коротка субметацентрична хромосома в цій групі.

Група F представлена хромосомами 19 і 20 – короткі метацентричні хромосоми, які не розрізняються між собою без диференційного забарвлення.

Хромосоми 21 і 22 належать до групи G. Хромосома 21 найбільш коротка акроцентрична хромосома в каріотипі людини. Коротке плече має здатність формувати супутники. Хромосома 22 – коротка акроцентрична хромосома, яка також спроможна своїм коротким плечем формувати супутники.

Статева хромосома Y – маленька акроцентрична хромосома, схожа за розмірами з хромосомами 21 і 22, але не має супутників.

**V. ДОСЛІДЖЕННЯ СТАТЕВОГО Х – ХРОМАТИНУ**

Визначення зміни числа статевих хромосом людини в епітеліальних клітинах слизової оболонки порожнини рота та інших органів можливо за допомогою експрес–методу.

Статевий хроматин поділяють на Х-хроматин, або тільце Барра, і Y-хроматин (був відкритий у 1970 р. шведським вченим Т. Касперсоном і Л. Цех). Х-хроматин представляє собою тільце розміром – 0,7 – 1,2 мкм. Прийнято вважати, що статевий хроматин (СХ) в живій тканині виглядає як подвоєна нитка; водночас, у фіксованій тканині ця форма може змінюватися залежно від локалізації, сусідства з іншими структурами ядра, методів фіксації та забарвлення матеріалу.

Статевий хроматин представляє собою щільне тільце, яке забарвлюється та виявляється в інтерфазних ядрах клітини у гетерогаметних (які мають Х та Y статеві хромосоми) тварин і людини. У зіскобах слизової оболонки порожнини рота статевий Х-хроматин найчастіше має вигляд рівно-випуклої, трикутної або овальної форми та має певну локалізацію, тобто прилягає до ядерної оболонки, що пояснюється впорядкованою архітектонікою хромосом в інтерфазному ядрі (рис. 2).

Значно менший за розмірами від Х–хроматину Y-хроматин. Виявити його можливо тільки при забарвленні ядра флюорохромами (акрихін, акрихініприт) в ультрафіолетовому світлі.

Методика дослідження полягає в тому, що у пацієнта проводиться зіскоб слизової оболонки порожнини рота шпателем. Мазок наноситься на скло, фіксується і забарвлюється ядерним барвником (Гімзи, ацетоорсеїном), аналізується під мікроскопом (під імерсією з вазеліновим маслом, збільшення ×100).

У клітинах жіночих організмів одна статева хромосома в інтерфазі частіше за все знаходиться в конденсованому стані і при забарвленні клітин ацетоорсеїном або барвником Гімзи визначається на поверхні ядерної оболонки клітин букального епітелію у вигляді глибки (Х-хроматину). Цінність застосування барвника ацетоорсеїну полягає в тому, що він дозволяє чітко ідентифікувати тонкі деталі ядерної субстанції клітин і навіть найтонші нитки, які зв’язують ядерце з тільцем Барра.

Кількість ядер з Х-хроматином залежить від інтенсивності розмноження клітин у даній тканині та від гормонального стану організму. Зміна кількості глибок статевого хроматину свідчить про зміну кількості статевих хромосом, що можна визначити при каріотипуванні людини.

У нормі кожна клітина містить певну кількість глибок Х-хроматину, яка на одиницю менше кількості статевих Х-хромосом у каріотипі. Так, у здорової людини чоловічої статі з каріотипом 46, ХY статевий Х-хроматин відсутній взагалі, як і у жінки з каріотипом 45,Х, а у чоловіків з каріотипом 47, ХХY – виявляється одна глибка статевого хроматину (рис. 2 а), подібно до здорової жінки.

У жінок з каріотипом 46, ХХ при оцінюванні препарату знаходять одну глибку статевого хроматину (рис. 2 б); при каріотипі 47, ХХХ у клітинах знаходять дві глибки Х-хроматину (рис. 2 в).

Клітини мазка оцінюють за наступними критеріями:

1. Форма ядра: в нормі ядро повинно бути великим, округлої або овальної форми, злегка забарвленим.

2. Структура ядерної мембрани: ядерна мембрана не повинна бути ушкодженою, з рівною лінією.

3. Розташування клітин у мазку: клітини не повинні накладатися одна на одну.

4. Локалізація статевого хроматину: за статевий хроматин повинно бути прийнято тільки злегка випукле темне тільце, яке локалізовано на ядерній мембрані

Зазвичай аналізується 100 епітеліальних клітин; визначається кількість глибок Х-хроматину на 100 клітин епітелію, що і є відсотком статевого Х-хроматину у конкретного пацієнта.

Статевий Х-хроматин визначається також і в сегментоядерних лейкоцитах у вигляді виросту ядра, так називаних «барабанних паличок», які визначаються у жіночої статі.

Таким чином, метод визначення статевого Х-хроматину є тестовим методом (експрес–аналіз), який застосовується для виявлення такого контингенту пацієнтів, яким необхідно проводити подальше цитогенетичне або більш поглиблене молекулярно-цитогенетичне дослідження.

**VI. ГЕНЕАЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕНННЯ**

Діагноз ряду спадкових хвороб не представляє істотних труднощів і ґрунтується на даних, отриманих в результаті загального клінічного обстеження ( наприклад, діагноз хвороби Дауна, гемофілії, адреногенитального синдрому). Однак у більшості випадків при діагностиці спадкових хвороб виникають серйозні труднощі у зв’язку з тим, що багато з цих хвороб за клінічними проявами дуже схожі з придбаними хворобами – так звані генокопії спадкових хвороб. Відомо також існування низки фенотипічно подібних, але гетерогенних в генетичному відношенні хвороб (наприклад, синдром Марфана та гомоцистинурія, галактоземія та синдром Лоу, фосфат-діабет та нирковий канальцевий ацидоз). Всі випадки протікають атипово, у відмінності від хронічних захворювань, тому потребують клініко – генеалогічного аналізу.

Генеалогічний метод був розроблений Ф. Гальтоном. Він представляє собою вивчення спадковості людини шляхом аналізу родоводів. Під час запису родоводів позначення:

* жінка – ,
* чоловік – ,
* власники альтернативних ознак – ,
* пробанд (особа, по відношенню до якої складено родовід) – ,
* шлюб – ,
* родинний шлюб – ,
* сибси (сестри та брати) – ,
* дизиготні близнюки – ,
* монозиготні близнюки – ,
* стать невідома – .

Членів одного покоління необхідно записувати в один ряд, старші розміщуються вище молодих. Покоління нумеруються зверху вниз римськими цифрами; представники одного покоління – зліва направо арабськими цифрами так, що кожний член родоводу отримує свій шифр.

Родоводи, до яких входять декілька поколінь з великою кількістю членів, зручно використовувати для визначення характеру успадкування ознаки. Ознайомлюючись з родоводом, відзначають, чи у кожному поколінні зустрічається ознака, або є пропуски, чи зустрічається ознака у чоловіків та жінок з однаковою частотою або у представників лише однієї статі. Якщо ознака виявляється у кожному поколінні, припускаємо, що вона домінантна. Перевіряємо це припущення, аналізуючи передачу ознаки в кожній родині. Враховуємо, що діти з домінантною ознакою з’являються (за виключенням нових мутацій) у родинах, де хоча б у одного з батьків він був. Діти з рецесивною ознакою можуть народитися у родинах, де батьки такої ознаки не мали. Якщо ознака однаково часто зустрічається у чоловіків та жінок, припускаємо, що він контролюється аутосомним геном. Якщо ознака зустрічається у представників однієї статі або переважно у одного представника статевої приналежності, припускаємо, що він зчеплений зі статевою хромосомою. Аутосомні гени чоловіків та жінок з рівною вірогідністю передають як синам, так і донькам; мати кожну з Х хромосом передає донькам та синам, а батько – Х хромосому передає донькам, а У – синам. Домінантні гени можуть бути не повністю пенетрантними – проявлятися не у всіх його власників. Якщо у батьків, які не мають домінантного гену, народжується дитина з домінантною ознакою, то нова мутація виключається, припускаємо, що один з батьків є власником домінантного гену, який не проявився у ознаці.

При аналізі родоводів слід також враховувати, що є ознаки обмежені статтю, а також ознаки, які контролюються декількома генами. Відхилення в успадкуванні ознаки в деяких сім’ях може бути пов’язане з нерозходженням хромосом. Ознаки, які контролюються генами, локалізовані у одній хромосомі, успадковуються разом, на відміну від ознак, які контролюються не зчепленими генами. Якщо захворювання зчеплене з локусом проявляється пізно, то за допомогою контролюючого генетичного маркеру, визначивши його наявність або відсутність, можливо спрогнозувати імовірність розвитку хвороби.

Особливий інтерес представляють у людини хвороби, які відносяться до мультифакторних захворювань (МЗ). Механізми розвитку МЗ багато в чому неясні. Враховуючи, що ключовими для гомеостазу є обмежена кількість біохімічних процесів, правомірно припустити, що в схильності до різних захворювань приймає участь якесь число одних і тих же генів. Ці гени можуть бути з різних систем – полігенні системи схильності. Все різноманіття клінічних варіантів МЗ відображає кількісне накопичення полігенних факторів схильності, взаємодіючих з різними по силі факторами середовища. Особливістю мультифакторних захворювань (МЗ), (до них відноситься більшість хронічних хвороб) є те, що у популяції вони зустрічаються частіше, ніж моногеннні. При оцінці ризику (МЗ) використовують таблиці емпіричного ризику. Ризик захворювання залежить від статі та кількості хворих родичів. Якщо хворий належить до рідко вразливої статі, то це являється високим ризиком, чим у тому випадку, коли хворий належить до досить часто вразливої статі. Ризик для родичів хворого пропорційний ступеню спорідненості та кількістю вражених осіб. При оцінці ризику слід також враховувати генетичні маркери захворювання – ознаки, які позитивно корелюють з захворюваннями. При аналізі родоводів важливо вміти розраховувати ступінь генетичної спорідненості, яка оцінюється часткою загальних генів. Родичі І ступеню спорідненості – батьки, діти, сибси мають половину загальних генів . У родичів ІІ ступеню спорідненості – пращури та онуки, дядьки (тітки) та племінники (племінниці) – одна четверть загальних генів. У родичів ІІІ ступеню спорідненості, двоюрідних сибсів – одна восьма. Кожний етап передачі генів зменшує ступінь спорідненості у два рази. У шлюбах між генетичними родичами підвищена вірогідність появлення нащадків з рецесивними ознаками, що важливо враховувати при медико – генетичному консультуванні.

До аналізу родоводів звертаються судові практики, коли необхідно довести або заперечити факт спорідненості, але генетичну спорідненість можливо довести лише з певною часткою вірогідності, заперечення споріднених зв’язків завжди абсолютне. Для встановлення спорідненості використовують генетичні маркери – ознаки, генетична природа яких доведена. При цьому маємо на увазі, що у дитини не може бути гену, якого не було у його батьків. Найбільш зручним маркером являються групи крові. Аналіз родоводів необхідний при медико-генетичному консультуванні при розрахунку вірогідності народження хворої дитини. Для цього необхідно знати тип успадкування захворювання та генотипи батьків. Завдяки родоводу можливо встановити генотип деяких його членів.

**6.1 ЗАДАЧІ**

1. За результатами обстеження сімей визначте, як успадковується у людини група крові системи MN.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Подружжя | Кількість пар | Діти |
| M × M | 69 | 134 М |
| N × N | 37 | 82 N |
| M × N | 82 | 173 MN |
| M × MN | 58 | 62 M, 75 MN |
| N × MN | 49 | 51 N, 58 MN |
| MN × MN | 47 | 43 N, 48 M, 91 MN |

2. Зрощення пальців на нозі успадковується як ознака, зчеплена зі статтю – по чоловічій лінії без пропусків у поколіннях. Яка генетична природа цієї аномалії?

3. Одна з форм катаракти успадковується як аутосомно - домінантна ознака з неповною пенетрантністю. Були вивчені родоводи, у яких катаракта зустрічається неодноразово і можливо було б виключити нові мутації. У 121 сім'ї, де були діти, хворі на катаракту, один з батьків також мав це захворювання, а у 44 сім'ях батьки були здорові. Визначте пенетрантність гену катаракти.

4. У братів групи крові 0 та АВ. Яка група крові у їхніх батьків?

5. У жінки має місце дефект будови кисті, який обумовлений домінантним аутосомним геном, а у її чоловіка – аутосомно – рецесивна аномалія зору. У сім'ї 11 дітей. У п'ятьох аномалія кисті, у чотирьох – дефект зору, у одного виявлені обидві аномалії, одна дитина здорова. Проведіть генетичний аналіз цієї сім'ї.

6. Глухота – рецесивна ознака. Молоде подружжя глухе. Аналіз родоводу кожного з них підтвердив аутосомно – рецесивний тип успадкування цієї ознаки у кожного з них. Тому вважали, що всі діти будуть глухими. У них народився син, донька та різностатева двійня. У всіх дітей був нормальний слух. Роз'ясніть цей випадок.

7. Група крові системи АВО контролюється локусом з трьома алель ними станами (АВО). Алелі А та В забезпечують наявність на еритроцитах А та В антигенів; О – означає відсутність антигенів А та В. У сім'ях, де батьки мають групу АВ, народжуються діти, з групами А, В та АВ у відношенні 1:1:2. Відомі дуже рідкі випадки, коли у таких сім'ях народжуються діти, у яких не виявляються ні антигени А, ні антиген В. Поясніть ці випадки.

8. У здорових батьків п’ятеро дітей. Два сина хворі на гемофілію, син та дві доньки здорові. Яка вірогідність захворювання гемофілією у онуків?

9. Антигени гістосумісності HLA використовуються для встановлення спорідненості. Визначте, який з трьох чоловіків може бути батьком дитини? Мати: А8 В4 В7 С2 С7; дитина А8 А2 В3 В7 С2 чоловіки: 1) А5 А7 В4 В9 С10; 2) А1 А2 В3 С2 С4; 3) А3 А5 В1 В2 С1 С4.

10. У членів однієї родини виявлені наступні антигени гістосумісності: жінка А30 В46 В4 С1, чоловік А30 А36 В4 С2, діти: 1) А30 В4 С2; 2) А30 В46 В4 С1;

3) А30 А36 В4 С1 С2; 4) А30 В46 В4 С1. У третьої дитини виявлено захворювання нирок та йому необхідна трансплантація цього органу. Нирку можуть дати батьки та старші сибси. Хто з них може бути донором?

**6.2 Відповіді**

1. M та N – кодомінантні алелі одного гену.

2. Локус зчеплений з У хромосомою.

3. 73 %

4. А та В

5. Дефект кисті – А, норма – а, аномалія зору – в, норма – В. Дружина АаВв, чоловік аавв, діти 5 АаВв, 4 аавв, 1 Аавв, 1 аавв. Аналіз зчеплення виконуємо за допомогою методу χ2:

Локуси зчеплені. Відстань між локусами 2/11=0,18=18%.



6. Глухота подружжя контролюється різними рецесивними генами. Їхній генотип ААвв та ааВВ. Генотипи їхніх дітей АаВв. АВ×АВ з'явилися нащадки з усіма можливими групами крові: АВ, А, В та О. Результати дослідження підтверджують другу гіпотезу.

7. Як і більшість ознак, група крові у людини контролюється не одним, а декількома генами. Не є проявником групоспецифічних властивостей, h – пригнічувач. Батьки АВНh × АВНh можуть мати дітей з генотипом – hh. У цьому випадку ознаки А та В не проявляться.

8. Мати гетерозиготна. Її доньки гетерозиготні з імовірністю ½. Ризик для онуків від доньок 1/8, Діти, як хворих, так і здорових синів будуть здоровими.

9. Другий чоловік.

10. Батько та старша дитина.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Акопян Г.Р. Центромерна нестабільність та поліморфізм хромосом в нормі і при патології людини: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня доктора мед. наук : спец. 03.00.15 «генетика» / Г.Р. Акопян. – К., - 40 с.

2. Атраментова Л.А. Генетика человека: Учеб. пособие. Харьков: ХГУ, 1990. – 91 с.

3. Багацька Н. В. Цитогенетика людини: навчальний посібник / Н.В Багацька – Х. : ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2014. – 164 с.

4. Ворсанова С.Г. Медицинская генетика / С.Г. Ворсанова, Ю.Б. Юров,

В.Н. Чернышов. – М.: Медпрактика, 2006. – 300 с.

5. Захаров А.Ф. Хромосомы человека. Атлас / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш,

Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина, 1982. – 263 с.

6. Зерова-Любимова Т.Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації / Т.Е. Зерова-Любимова, Н.Г. Горовенко. – К.: КМАПО ім.. П.Л. Шупика, 2003. - 23 с.

7. Зерова-Любимова Т.Е. Стандарти аналізу препаратів хромосом людини: Методичні рекомендації / Т.Е. Зерова-Любимова, Н.Г. Горовенко. – К.: КМАПО ім.. П.Л. Шупика, 2003. – 52 с.

8. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature //

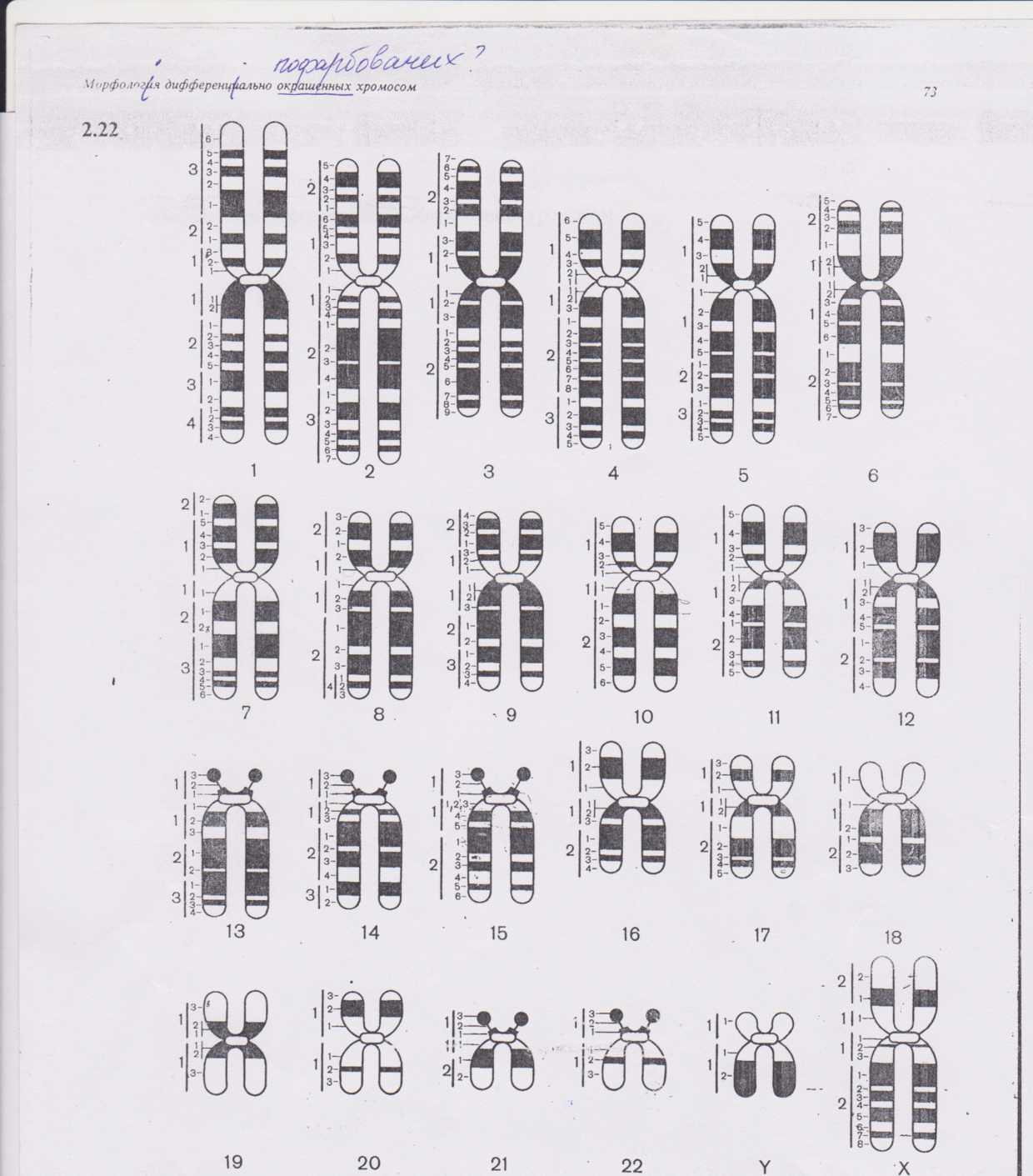
Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. – 2009. – 138 p.

9. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature // Recommendation of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. The Normal Human Karyotype G-and R-bands. – 2.

**8.** **ДОДАТКИ**

**Рис. 1.**

**Морфологія диференційовано пофарбованих хромосом**



б)

а)

в)

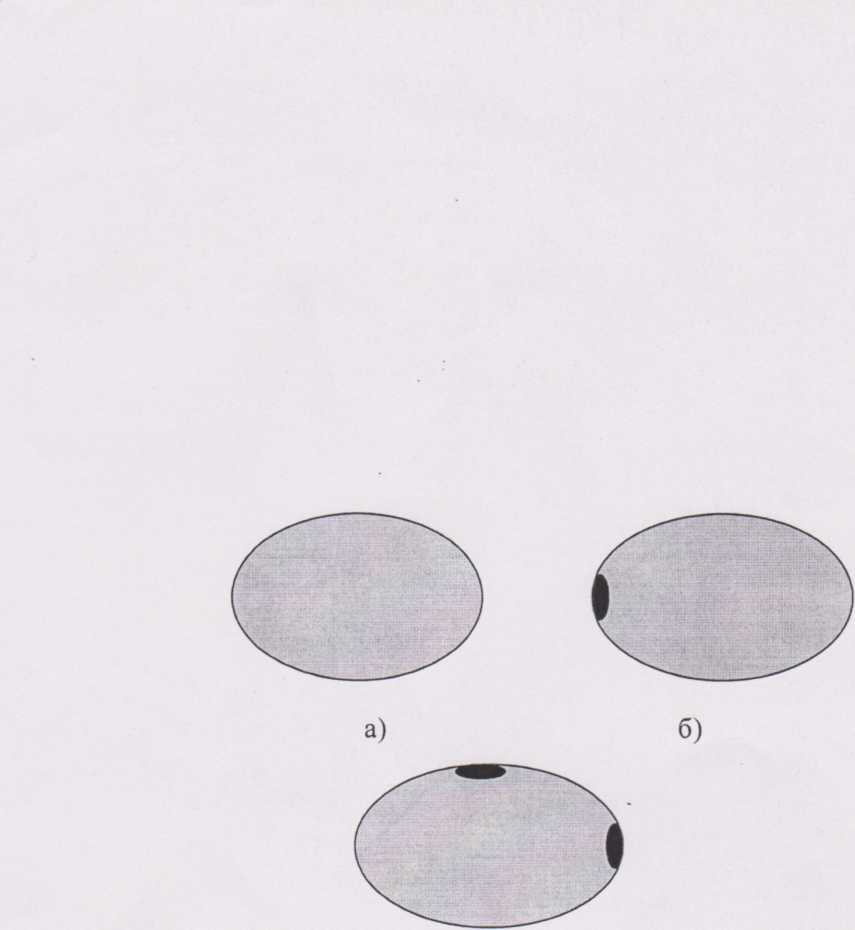


Рис. 2. Схематичне зображення статевого Х-хроматину в клітинах букального епітелію в нормі та при патології: а) - відсутність глибки Х-хроматину в клітинах букального епітелію у здорового чоловіка (каріотип - 46,ХУ) і жінки із синдромом Шерешевського-Тернера (каріотип - 45,Х); б) - наявність однієї глибки Х-хроматину в клітинах букального епітелію у здорової жінки (каріотип - 46.ХХ) і чоловіка із синдромом Клайнфельтера (каріотип - 47, ХХУ); в) - наявність двох глибок Х-хроматину у жінки з трисомією X (каріотип - 47,XXX).

*Навчальне видання*

**Супрун** Еліна Владиславівна

**Крижна** Світлана Иванівна

**Березнякова** Марина Євгенівна

**Литвинова** Ольга Миколаївна

**Ковальова** Валентина Іванівна

**Козар** Валентина Вікторовна

**Литвиненко** Ганна Леонідівна

**МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ**

**СПАДКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

Методичні рекомендації

для аудиторної роботи студентів

*За редакцією проф. Е.В. Супрун*