Діагностика спадкових хвороб

ЛЕКЦІЯ 13

План:

1. Синдромологічний аналіз
2. Цитогенетичні методи
3. Метод каріотипування
4. Молекулярно-цитогенетичні методи
5. Молекулярно-генетичні методи
6. Метод дерматогліфіки
7. Біохімічні методи

Синдромологічний аналіз (Портретна діагностика)

Синдромологічний аналіз – це аналіз фенотипу хворого (мікроаномалій, вад розвитку та інших симптомів) з метою виявлення стійкого поєднання ознак для встановлення діагнозу. При аналізі фенотипу хворого особливу увагу звертають на мікроаномалії і вади розвитку. Мікроаномалії (до 6) можуть зустрічатися у здорових людей, але для хворих зі спадковою патологією характерна їх більша кількість і специфічне поєднання. Синдромологічний аналіз фенотипу хворого є основним для діагностики найбільш поширених моногенних хвороб і синдромів, що виявляються вадами розвитку, – ахондроплазії, синдрому Апера, синдрому Франческетті та інших. Синдромологічний аналіз – важливий допоміжний метод в діагностиці спадкових хвороб сполучної тканини (синдроми Марфана, Елерса-Данло), деяких хвороб накопичення («грубе обличчя» у хворих з мукополісахаридозом та інших СХО). Цей метод є допоміжним в діагностиці хромосомних хвороб. Для уточнення діагнозу спадкової патології широко використовуються атласи спадкових синдромів.

Використання комп’ютерних діагностичних програм і баз даних.

Є різні діагностичні програми (переважно, комерційні), які можна знайти у мережі Інтернет. Однією з найкращих англомовних вважається програма "Possum" (The London Date Bases), яка містить описи спадкових захворювань з портретами хворих. Спеціальні комп’ютерні діагностичні програми використовуються для аналізу результатів цитогенетичних і молекулярно-генетичних досліджень, пренатальної діагностики (аналіз результатів біохімічного і ультразвукового скринінгу і розрахунку індивідуального генетичного ризику). У США створений і щодня поповнюється електронний каталог генів і моногенних хвороб В. Мак-Кьюсика «On-line Mendelian Inheritance in Man – OMIM» http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Цитогенетичні методи базуються на вивченні каріотипу людини, до них належать:

1) каріотипування;
2) молекулярно-цитогенетичні методи;
3) визначення статевого хроматину.

Показання до цитогенетичної діагностики:

- Підозра на хромосомну хворобу за клінічною симптоматикою (для підтвердження діагнозу).
- Діти з множинними природженими вадами розвитку і їхні батьки.
- Діти із затримкою психомоторного розвитку і їхні батьки.
- Діти із затримкою і аномаліями статевого розвитку.
- Подружні пари, у яких спостерігається невиношування вагітності (більше двох спонтанних абортів) або інші репродуктивні втрати.

- **Подружні пари з обтяженим анамнезом (мертвонародження, наявність дитини з природженими вадами розвитку або хромосомною хворобою, виявлення хромосомної патології у членів сім’ї).**
- **Безплідні подружні пари або порушення репродуктивних функцій у жінок або чоловіків.**
- **Донори статевих клітин, які звернулися в центр штучного запліднення.**
- **Лейкоз (для диференціальної діагностики, оцінки ефективності лікування і прогнозу перебігу).**
- **Оцінка мутагенних впливів (радіаційних або хімічних).**

Метод каріотипування **дозволяє вивчити каріотип в цілому (тобто кількість і структуру хромосом). Хромосоми людини вивчають на стадіях метафази і прометафази мітозу.**

Вивчення *метафазних* хромосом (препарат має назву «метафазна пластинка»). Для діагностики більшості хромосомних хвороб метафазні пластинки виготовляють з лімфоцитів периферичної крові. Придатні також фібробласти шкіри, клітини червоного кісткового мозку. Для пренатальної діагностики культивують клітини амніотичної рідини, ворсин хоріона, плаценти, ембріональні тканини.

Метафазні пластинки з лімфоцитів периферичної крові (використовують венозну кров одержують таким чином. Кров (1–2 мл) вміщують в спеціальне живильне середовище з фітогемагглютиніном (якій спричинює імунологічну трансформацію лейкоцитів і їхній поділ) в термостат на 48–72 год. За 2–3 год до кінця культивування додають колхіцин, якій руйнує веретено поділу і зупиняє поділ клітини на стадії метафази. Потім клітини обробляють гіпотонічним розчином хлориду калію або цитрату натрію і клітинну суспензію фіксують і наносять на предметне скло. При висиханні фіксатора клітини і хромосоми міцно прикріпляються до скла. Препарат забарвлюють ядерними барвниками. При *рутинному* забарвленні препарат забарвлюють азур-еозином за Романовським-Гімзе; при цьому всі хромосоми забарвлюються рівномірно за всією довжиною. Рутинне забарвлення дозволяє підрахувати кількість хромосом, розподілити їх по групах і виявити грубі хромосомні аберації. Для детальної характеристики аберацій використовуються різні способи *диференціального* фарбування: G-, R-, Q-, C-забарвлення.

Найбільш широко використовують G-забарвлення (від англ. Giemsa stain). Хромосоми перед забарвленням за Романовським-Гімзе заздалегідь обробляють протеазами (трипсином). Хромосоми після забарвлення стають смугастими: в них чергуються темні і світлі смуги. Зважають, що темні смуги (G-смуги) – ділянки гетерохроматину, а світлі (R-смуги) — еухроматину. Зазвичай в гаплоїдному наборі можна налічити до 400 сегментів, кожний сегмент містить близько 8 млн п. н. Розроблено форму представлення стилізованого ідеального каріотипу з типовим рисунком смуг що має назву «ідіограма».

R-забарвлення (від англ. reverse banding – зворотне забарвлення). Рисунок смуг зберігається, але їх колір змінюється на протилежний порівняно з G-забарвленням.

Q-забарвлення (від англ. quinacrine – квінакрин – один із флуоресцентних барвників) – історично перший метод, розроблений Касперсоном (Caspersson, 1968). При цьому методі хромосоми після забарвлення вивчають за допомогою люмінесцентного мікроскопа.

C-забарвлення (від англ. constitutive heterochromatin – конститутивний гетерохроматин). Препарати обробляють лугами, а потім забарвлюють за Романовським- Гімзе. При цьому добре забарвлюються центромери всіх хромосом, довге плече Y-хромосоми та інші ділянки, багаті на гетерохроматин.

У 1971 р. на Паризькій конференції було порівняно дані, одержані при різних методах диференціального забарвлення. Виявилося, що всі методи виявляють у принципі одні і ті самі структури, але кожен з них специфічний щодо певних хромосомних сегментів.

Вивчення *прометафазних* хромосом (диференціальне забарвлення з високою роздільною здатністю). Прометафазні хромосоми довші, ніж хромосоми на стадії метафази. При диференціальному забарвленні прометафазних хромосом можна розглянути від 550 до 850 сегментів. При цьому сегменти, спостережувані в метафазних хромосомах, можна підрозділити на субсегменти. Цей метод використовують для діагностики мікроделецій, мікродуплікацій і складних хромосомних аберацій.

Молекулярно-цитогенетичні методи **поєднують традиційні цитогенетичні методики з молекулярно-генетичними технологіями. Основним є метод флюоресцентної гібридизації in situ (*FISH-метод*). Методика містить гібридизацію in situ (тобто на предметному склі) забарвлених флуоресцентними барвниками ДНК-зондів з метафазними або інтерфазними хромосомами. Зонд – це ділянка одноланцюжкової ДНК, комплементарна певній ділянці гена або хромосоми. Зондами можуть служити послідовності ДНК, виділені з геному штучним чином, синтезовані або клоновані за допомогою бактеріальних плазмід або іншими способами. Для FISH-методу зонди мітять біотином або дигоксигеніном, до яких потім приєднуються флуоресцентні барвники.**

Метод містить такі етапи:

1. **Готують препарат метафазних, прометафазних або інтерфазних хромосом.**
2. **Препарат обробляють лугами. При цьому відбувається денатурація ДНК, тобто розриваються водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК.**
3. **На скло капають ДНК-зонди. Зонди з'єднується з комплементарними послідовностями ДНК хромосом. Відбувається так звана гібридизація – з'єднання за принципом комплементарності нуклеїнових кислот, виділених із різних джерел: ДНК пацієнта і ДНК зонда.**

Препарат відмивають від надлишку зонда, обробляють флуоресцентними барвниками (які приєднуються до біотину або дигоксигеніну): родамін дає червоне світіння, флюоресцеїн ізотіоціанат – зелене світіння

1. **Препарат вивчають під люмінесцентним мікроскопом. Ділянки хромосом, де відбулася гібридизація і де знаходяться зонди, дають вищезазначене світіння.**

У клінічній генетиці метод використовують для швидкої діагностики хромосомних хвороб, пов'язаних зі зміною кількості хромосом в інтерфазних ядрах, а також для діагностики мікроделецій, мікродуплікацій і складних хромосомних перебудов. Розроблено різні типи зондів: до певного локусу хромосоми, до теломерів, до різних локусів однієї і тієї ж хромосоми, до центромерів певних хромосом. Так, синтезовано зонди до центромерів 13, 18, 21, X і Y хромосом. Їх використовують для швидкої пренатальної діагностики найбільш розповсюджених хромосомних синдромів в інтерфазних клітинах ворсин хоріона або амніотичної рідини.

Визначення статевого хроматину – експрес-метод, що дозволяє визначити кількість статевих хромосом, але потребує подальшого каріотипування для підтвердження діагнозу.

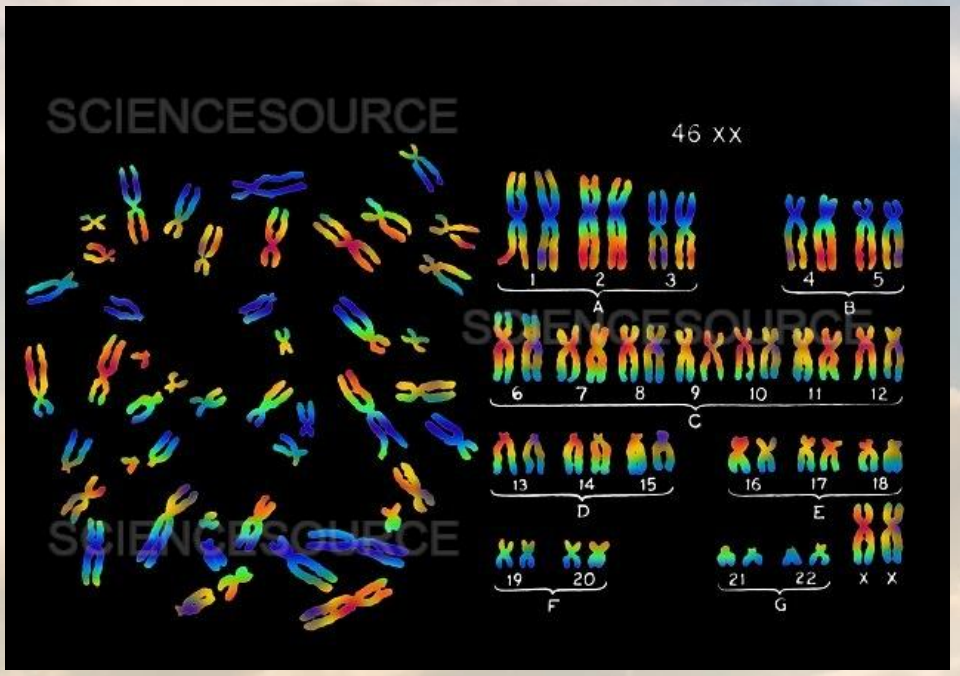
Х-статевий хроматин (тільця Барра). Одна із Х-хромосом жінок інактивується і спіралізується на 16–19-ту добу ембріонального розвитку, а друга залишається активною. Спіралізована Х-хромосома помітна в ядрах соматичних клітин у вигляді темної, добре забарвленої грудки. В епітеліальних клітинах (із слизової щоки) грудки статевого хроматину розташовуються під ядерною мембраною. У жінок статевий хроматин знаходять більше як у 20 % клітин, у чоловіків – в нормі відсутній. У нейтрофільних лейкоцитах тільця Барра мають вид барабанних паличок, які в нормі у жінок виявляються в 1–2 % лейкоцитів, а у чоловіків відсутні.

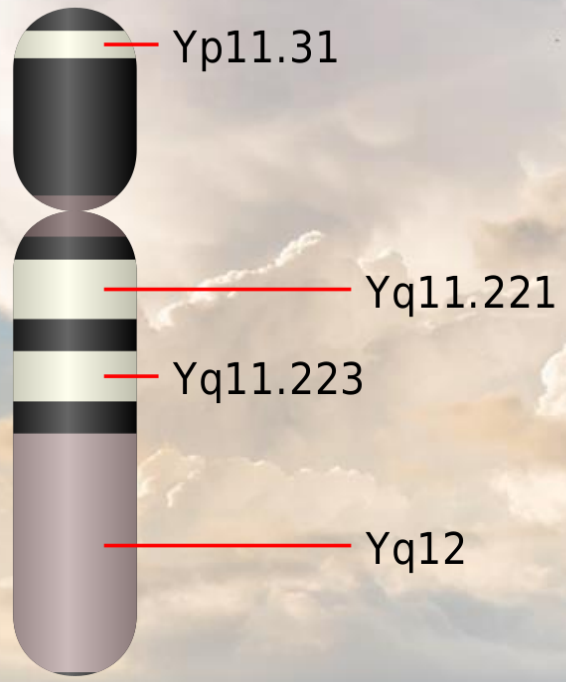
Метод використовують:

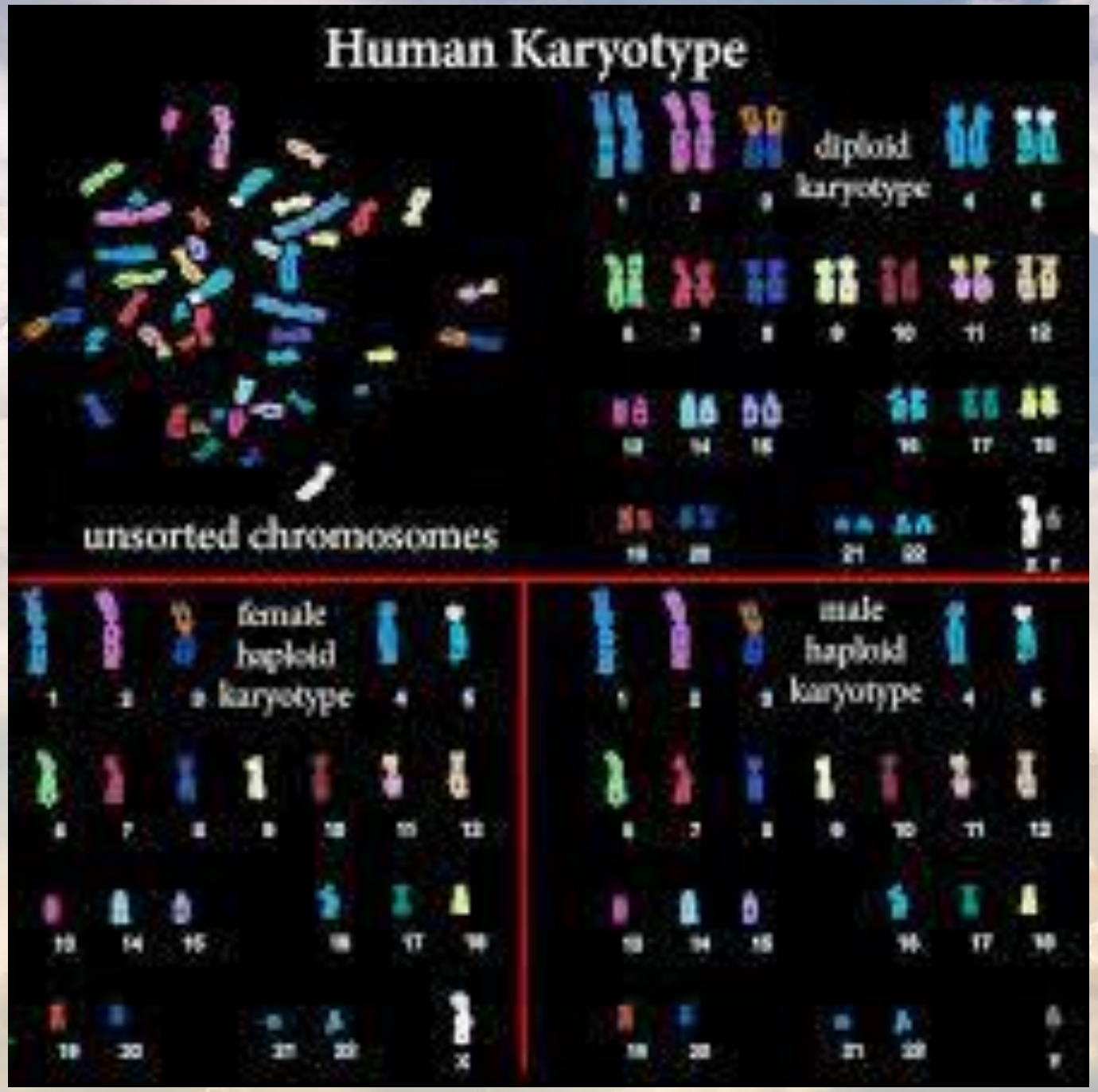
- для експрес-діагностики хромосомних хвороб, пов'язаних із зміною кількості Х-хромосом;
- як експрес-метод діагностики статі при гермафродитизмі;
- у судовій медицині для визначення статевої приналежності фрагментів трупа людини (тільця Барра добре зберігаються в хрящовій тканині).

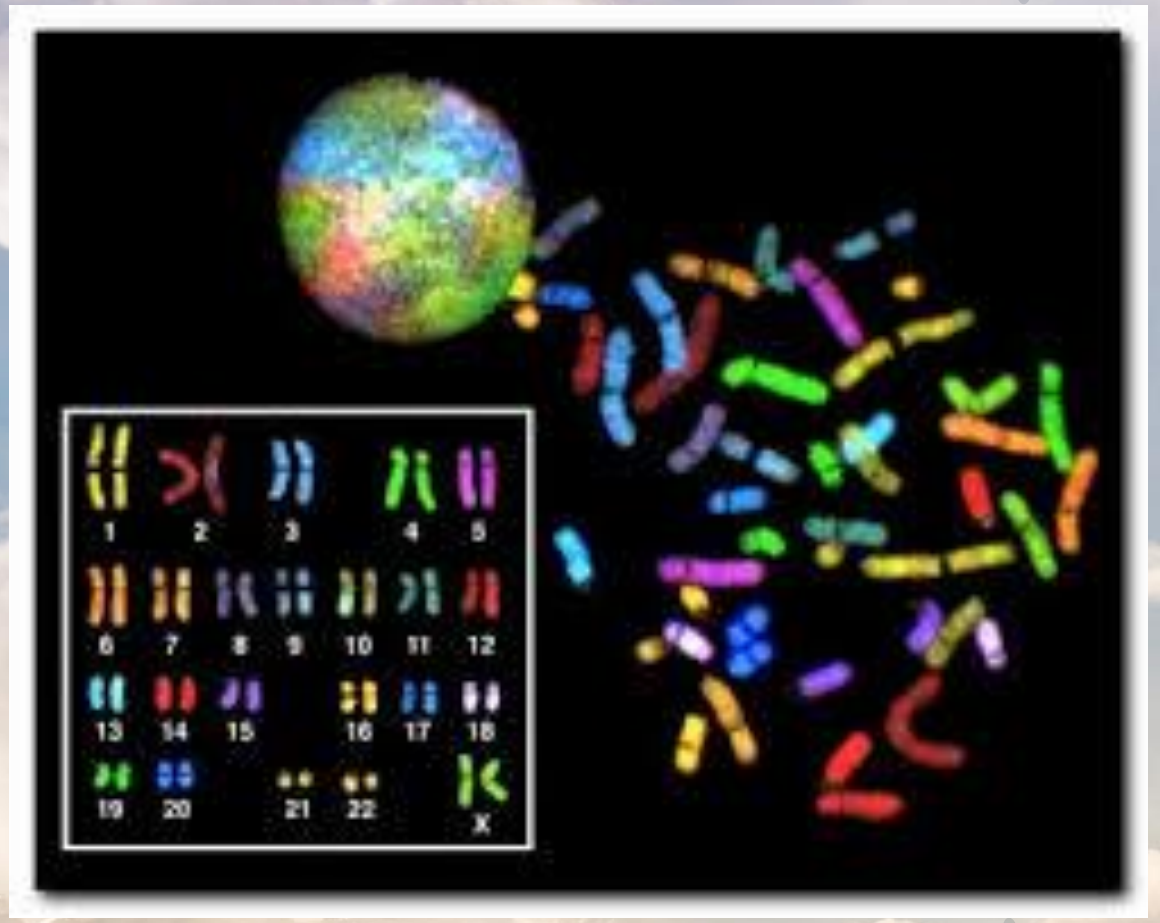
Основні цитогенетичні методи	Відсоток хромосомної патології, який може бути виявлений з використанням даної методики
Каріотипування з рутинним забарвленням	30 %
Методи диференціального забарвлення метафазних хромосом	60 %
Методи дослідження прометафазних хромосом (диференціальне забарвлення з високою роздільною здатністю)	75 %
Молекулярно-цитогенетичні методи (FISH-метод)	До 95–99 %

Y-статевий хроматин **– це інтенсивно флуоресціююча ділянка довгого плеча Y-хромосоми в інтерфазних ядрах. Його можна визначити в букальному зскрібку, лейкоцитах периферичної крові. Препарат забарвлюють флуоресцентним барвником акрихін-іпритом. Під люмінесцентним мікроскопом Y-хроматин виявляється в ядрі клітини як яскрава пляма діаметром 0,3–1,0 мкм. У чоловіків в нормі одна грудка Y- хроматину. Метод використовується для експрес-діагности синдрому полісомії Y.**






Human Karyotype
diploid karyotype
unsorted chromosomes
female haploid karyotype
male haploid karyotype


1 2 3 4 5
6 7 8 9 10 11 12
13 14 15 16 17 18
19 20 21 22 X

Молекулярно-генетичні методи (методи ДНК-діагностики). **Це велика і різноманітна група методів, призначена для виявлення варіацій у структурі досліджуваної ділянки ДНК Показання до ДНК-діагностики:**

1. **Підтвердження клінічного діагнозу моногенного захворювання та уточнення типу мутації.**
2. **Пресимптоматична діагностика – коли клінічні ознаки захворювання з пізнім дебютом відсутні.**
3. **Виявлення гетерозиготних носіїв мутації у випадках аутосомно-рецесивних або зчеплених з Х-хромосомою захворювань**
4. **Пренатальна діагностика моногенних хвороб.**
5. **Діагностика преімплантаційна.**

1. **Виявлення генетичної схильності до мультифакторіальних захворювань.**
2. **Ідентифікації особи (геномна дактилоскопія) і встановлення спорідненння в судовій медицині.**
3. **Діагностика онкологічних захворювань.**
4. **У клінічній фармакогенетиці для визначення типу метаболізму лікарських препаратів.**
5. **Діагностика інфекційних захворювань (виявлення ДНК або РНК збудника**
6. **Для визначення стійкості збудників інфекційних захворювань до антибіотиків. Формування стійкості пов’язане з мутаціями певних генів, які можна ідентифікувати.**
7. **У перспективі – для створення генетичного паспорта будь-якої людини.**

Для молекулярно-генетичної діагностики використовують будь-які ядровмісні клітини.

- **Для діагностики спадкового захворювання частіше беруть кров (лейкоцити), рідше змиви з порожнини рота, волосяні фолікули.**
- **Для пренатальної діагностики проводять хоріоцентез (отримання ворсинчастої оболонки – хоріона), плацентоцентез (отримання тканини плаценти), амніоцентез (отримання клітин з амніотичної рідини), кордоцентез (отримання пуповинної крові).**
- **Для доімплантаційної діагностики – бластомер або полярне тільце.**
- **У судовій медицині для ідентифікації особи – будь-які тканини (плями крові, шкіра, сперма тощо), для встановлення спорідненння за допомогою методів дактилоскопії – кров.**
- **Для діагностики інфекційних захворювань – зскрібки з піхви, уретри, бронхолегеневі змиви, сироватку крові, культури збудників.**
- **Для діагностики онкологічних захворювань – червоний кістковий мозок тощо.**
- **Для діагностики мітохондріальних хвороб основним джерелом ДНК є біоптат м'язів.**

Етапи ДНК-діагностики з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Метод було розроблено в 1983 р. К. Мюллісом (США); за його розробку в 1993 р. йому було присуджено Нобелівську премію в галузі біології і медицини. Виділяють такі етапи: *виділення ДНК* (методами лізису клітин з подальшим очищенням від білкових компонентів) та власне *полімеразну ланцюгову реакцію*, яка дозволяє вибірково ампліфікувати (багатократно редуплікувати) необхідну ділянку ДНК в мільйони раз.

Необхідною умовою для проведення ПЛР є знання нуклеотидної послідовності ділянки ДНК, оскільки специфічний вибір цієї ділянки здійснюється шляхом гібридизації матричної ДНК з двома штучно синтезованими праймерами (олігонуклеотидні послідовності ДНК комплементарні 3'-кінцям ампліфікованої ділянки на змістовій і антизмістовій нитках ДНК); відстань між праймерами визначає довжину синтезованих фрагментів ДНК. По суті, метод ПЛР імітує природний процес редуплікації ДНК. До складу реакційного розчину вводять ДНК обстежуваної людини, чотири види нуклеотидів ДНК, а також термостабільну ДНК-полімеразу (Taq-полимеразу), яка зберігає свою активність при високій температурі (оптимум роботи – 72°С.). Фермент було виділено з бактерій гарячих джерел (T. aquaticus).

Проведення реакції здійснюється циклічно в спеціальній буферній суміші з певними концентраціями іонів калію, хлору, магнію і точним значенням pH. Цикл має *три фази*:

1. Денатурація (суміш нагрівають до 90–95°C). ДНК переводиться в одноніткову форму.
2. Гібридизація (суміш охолоджують до 45–60°C), праймери з'єднуються з комплементарними ділянками ДНК.
3. Синтез (суміш знов нагрівають до 72°C): термостабільна ДНК-полімераза синтезує дочірній ланцюг ДНК від місця гібридизації праймера у напрямі 3'–5'. При цьому праймер включається до складу щойно синтезованої ділянки нуклеїнової кислоти. У подальших циклах щойно синтезовані молекули ДНК стають, у свою чергу, матрицею для аналогічного синтезу нових копій.

Суміш ставлять у спеціальний прилад – термоциклер, або ампліфікатор. У ньому автоматично відбувається зміна температур, необхідних для реакції. Якщо уявити собі, що в реакційній суміші знаходилася одна молекула ДНК з ділянкою, яку необхідно редуплікувати, то після першого циклу одержують 2 молекули, після другого циклу – 4 тощо. Кількість вказаних циклів в ПЛР становить зазвичай від 25 до 30. У результаті кількість копій ДНК збільшується в мільйони разів.

Аналіз одержаних результатів. **Фрагменти з нормальною і мутантною послідовностями можуть відрізнятися за електрофоретичною рухливістю, тому часто проводиться електрофорез ампліфікованих фрагментів у гелі. Для ідентифікації ампліфікованих фрагментів можуть бути використані *методи секвенування*, а також *метод алель-специфічних олігонуклеотидів*, який грунтується на гібридизації ампліфікованих фрагментів ДНК з міченими олігонуклеотидами, комплементарними нормальній або мутантній послідовності ДНК. Прикладом такого підходу є застосування ДНК-чипів.**

Модифікації ПЛР:

Мультиплексна (мультипраймерна) ПЛР – грунтується на одночасній ампліфікації в одній реакції кількох екзонів досліджуваного гена або кількох фрагментів різних генів, що дозволяє проводити експрес-скринінг найбільш частих мутацій в гені або виявляти водночас мутації в різних генах.

Алель-специфічна ампліфікація – грунтується на використанні різних праймерів, один з яких комплементарний нормальній, а другий – мутантній послідовності ДНК. В результаті такої реакції в розчині синтезується два різновиди ПЛР-продуктів –нормальні і мутантні, що розрізняються за своєю довжиною.

Метод сайт-спрямованої модифікації ампліфікованої ДНК **– грунтується на використанні в ПЛР специфічного mismatch-праймера, відмінного від матричної послідовності на 1 нуклеотид. В результаті включення такого праймера до складу мутантного ПЛР- продукту в ньому утворюється штучно створений сайт рестрикції для однієї з рестриктаз, що дозволяє провести ДНК-діагностику за допомогою рестрикційного аналізу.**

Існують способи проведення ПЛР, які дозволяють вивчати не тільки ДНК, але і РНК. Це важливо при дослідженні РНК-вмісних вірусів (ретровіруси, зокрема ВІЛ, вірус гепатиту С, грипу А тощо.), а також при аналізі експресії різних генів в організмі. Подібні методики зазвичай включають два етапи: зворотну транскрипцію і ПЛР на матриці одержаної ДНК.

ПЛР у реальному часі. **Цей метод не потребує електрофорезу продуктів ампліфікації в агарозному або поліакриламідному гелі. Реєстрація наявності або відсутності продуктів ампліфікації може здійснюватися двома шляхами: реєстрацією флюоресценції продуктів ампліфікації або за характером температурних кривих етапу відпалу, які залежать від наявності або відсутності шуканої ДНК-мішені. Застосування ПЛР у реальному часі дозволяє значно заощадити час і скористатися перевагами «закритої системи», оскільки не потрібно відкривати пробірки з реакційною сумішшю (запобігання можливості контамінації устаткування і матеріалів продуктами ампліфікації і виникнення хибнопозитивних результатів. Метод real-time PCR особливо перспективний при діагностиці вірусних і бактеріальних інфекцій.**

Прямі і непрямі методи ДНК-діагностики:

1) **Пряма ДНК-діагностика передбачає виявлення мутації в досліджуваному гені; для неї необхідно точно знати структуру гена (або конкретної ділянки гена з мутацією).**
2) **Непряма діагностика використовується при захворюваннях, коли ген картований, але будова гена, характер мутацій в ньому недостатньо з'ясовані. Суть непрямої ДНК- діагностики полягає в аналізі успадкування у хворих і здорових членів сім'ї поліморфних генетичних маркерів, зчеплених з геном хвороби (тобто які розташовані у сусідніх локусах в хромосомі і успадковуються зчеплено – за законом Моргана). В якості таких маркерів можуть бути сайти рестрикції для певних рестриктаз, поліморфізм мінісателітних і мікросателітних послідовностей.**

Метод дерматогліфіки заснований на вивченні рисунка шкіри на пальцях, долонях і підошвах. Вивчення узорів на подушечках пальців називається дактилоскопією, на долонях – пальмоскопією, на підошвах – плантоскопією. Огляд згинальних складок проводять неозброєним оком. Папілярні лінії в грудному віці досліджують за допомогою 3- або 5-кратної лупи. У медичній генетиці метод використовується як допоміжний для діагностики хромосомних хвороб.

Особливості дерматогліфіки при хромосомних хворобах:

1) Чотирипальцева поперечна долонна складка.
2) Кілька дуг на пальцях рук.
3) Радіальні петлі на 1, 4 або 5 пальцях кисті.
4) Дистальний осьовий тридіус, збільшення кута atd.
5) Аплазія підпальцевих тридіусів.
6) Поперечна згинальна борозна на підошві.
7) Дуговий узор на полі I пальця підошви.

Об’єктами біохімічної діагностики (переважно спадкових хвороб обміну речовин) можуть бути сеча, піт, плазма і сироватка крові, кров висушена на хроматографічному або фильтровальному папері, спинномозкова рідина, амніотична рідина, культура клітин. Якщо специфічний дефект ферменту призводить до накопичення метаболітів з низькою молекулярною масою і високою проникністю, вони можуть виходити в міжклітинний простір. Низькомолекулярні метаболіти можуть бути ідентифіковані в плазмі крові або сечі за допомогою різних методик: інгібіція росту бактерій, тонкошарова хроматографія, газова хроматографія, рідинна хроматографія, спектрометрія тощо.

Якщо метаболіти мають велику молекулярну масу, вони накопичуються в клітинах, приводячи до збільшення органоїдів і появи вакуолей. Захворювання, пов’язані з порушенням катаболізму крупних молекул, діагностуються шляхом визначення активності ферментів в тканинах або клітинах.

Принципи біохімічної діагностики ґрунтуються на патогенезі ферментопатій. Вони можуть бути спрямовані на визначення:

1) **надмірної кількості речовини, метаболізм якої порушений;**
2) **аномальних метаболітів в крові і сечі;**
3) **дефіциту нормальних метаболітів;**
4) **активності ферменту, що відповідає за метаболічний шлях.**

Диференціальна діагностика ферментопатій за клінічною картиною, особливо у новонароджених і дітей раннього віку, утруднена, оскільки схожу клінічну картину можуть мати різні ферментопатії. Це обумовило необхідність створення спеціальних тест-програм.

Біохімічну діагностику, як правило, проводять в два етапи: 1) первинна діагностика (скринінг); 2) уточнення діагнозу.

Скринінг може бути селективним або масовим.

***Селективний біохімічний скринінг* проводиться серед груп дітей і дорослих з клінічними ознаками спадкового дефекту обміну речовин. Йдеться про «просіювання» контингентів дітей або дорослих, серед яких можна з високою вірогідністю чекати хворих із спадковими хворобами обміну.**

Показання для селективного скринінгу:

1) **ЗПР у дітей раннього віку, розумова відсталість у дітей старшого віку;**
2) **неврологічні порушення (судоми, зниження м'язового тонусу, спастичні парези);**
3) **диспепсичні явища, непереносимість окремих продуктів і ліків;**
4) **порушення фізичного розвитку дітей (затримка маси та росту, деформація кісток т.);**
5) **інші симптоми ферментопатій (катаракта, порушення слуху, зору, специфічний колір і запах сечі, шкірні прояви тощо).**

У селективних програмах можуть використовуватися якісні і напівкількісні методи, матеріал – сеча або кров. При підозрі на наявність спадкової патології обміну речовин у першу чергу проводиться сечовий скринінг. Для сечового скринінгу використовують 15- 20 простих якісних реакції, які охоплюють максимально широкий круг метаболічних дефектів. Ці реакції спрямовані на виявлення метаболітів, що характерні для цілої групи захворювань.

При підозрі на порушення певної ланки метаболізму проводиться діагностика за допомогою тонкошарової хроматографії амінокислот, ліпідів, вуглеводів, та олігосахаридів; кількісне визначення глікозаміногліканів та сечової кислоти в сечі.

В ряді випадків для скринінгу досліджують кров. Так, методом електрофорезу виявляються дефекти обміну гемоглобіну (гемоглобінопатії); при підозрі н мітохондріальні хвороби визначають вміст пірувату і лактат; тонкошарова хроматографія амінокислот використовується для діагностики аміноацидурій.

Кінцевий етап біохімічної діагностики – це точна верифікація захворювання. Для уточнення діагнозу використовують кількісні високотехнологічні методи біохімічної діагностики. Так, для виявлення спадкових порушень обміну органічних кислот, жирних кислот, амінокислот, мітохондріальних хвороб використовують методи газової хроматографії і мас-спектрометрії; для визначення амінокислотного спектру крові і сечі - амінокислотний аміноаналізатор; кількісна рідинна хроматографія – для діагностики хвороб обміну органічних кислот, амінокислот, мітохондріальних хвороб, порушення циклу сечовини; колориметричний метод – для визначення рівня оротової кислоти в сечі, для діагностики порушення обміну сечової кислоти, для діагностики ряду хвороб корисними є хроматографія на іоно-обмінних смолах, метод газо-рідинної хроматографії та інші. Активність ферменту може досліджуватись в культурі клітин (лізосомні хвороби, мукополісахаридоз).

Для підтвердження діагнозу могуть використовуватися не тільки біохімічні методи, але й цитохімічні, молекулярно-генетичні методи, біопсія тканин та органів з подальшим дослідженням гістологичних препаратів під світловим або електронним мікроскопом тощо.

Масовий скринінг **– це масове обстеження всіх новонароджених з метою раннього виявлення на доклінічній стадії захворювання, для якого розроблено методи профілактичного лікування. Раннє лікування запобігає розвитку клінічних ознак хвороби. Основні вимоги до скринінгових програм для масового неонатального скринінгу:**

1. **Висока частота захворювання в популяції. Оскільки частота певних спадкових хвороб обміну варіює у різних популяціях, перелік захворювань може відрізнятись у різних країнах та етнічних групах. У більшості випадків скринуються захворювання, що зустрічаються в популяції з частотою 1:10 000 і частіше (іноді – менш поширенні захворювання).**
2. **Захворювання без своєчасного лікування призводить до тяжких порушень здоров'я, ранньої інвалідизації.**
3. **Повинні існувати способи профілактичного лікування.**

1. **Методи діагностики мають бути високочутливими (не давати хибнонегативних результатів), специфічними (допускається невеликий відсоток хибнопозитивних результатів), економічними; біологічний матеріал для діагностики має бути доступним. У більшості програм досліджують кров.**
2. **Тип успадкування хвороби та її патогенез повинні бути чітко з'ясовані, для родини можливе медико-генетичне консультування.**
3. **Витрати на скринінг-програми не повинні перевищувати витрат на лікування й утримання хворих, які стали інвалідами внаслідок даного захворювання.**

Програма обов’язково містить такі етапи:

1) взяття біологічного матеріалу для дослідження у всіх новонароджених і доставка матеріалу в діагностичну лабораторію;

2) лабораторна просіваюча діагностика; 3) уточнююча діагностика всіх випадків з позитивними результатами при просіюванні; 4) лікування хворих і їхня диспансеризація з контролем за ходом лікування; 5) медико-генетичне консультування сім’ї.

Програми масового скринінгу на спадкові хвороби, що піддаються профілактичному лікуванню, можуть запроваджуватися тільки у межах державної або регіональної системи охорони здоров’я. Україні проводиться масовий скринінг новонароджених на фенілкетонурію. З урахуванням частоти, ефективності профілактичного лікування, економічної значущості патології впроваджується проведення масового неонатального скринінгу вродженого гіпотиреозу.

Використані джерела:

1. Запорожан В. М. Та ін. Медична генетика: Підручник для вузів. Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2005. 260 с. ISBN 966-7733-66-1
2. Бужієвська Т.І. Основи медичної генетики. Київ : Здоров'я, 2001. 136 с. ISBN 5-311-01204-8
3. Помогайбо В.М. Генетика людини : навч. посіб. Київ : ВЦ «Академія», 2014. 280 с.
4. Рубан Э.Д. Генетика человека с основами медицинской генетики : учебник. Ростов-на-Дону : Феникс, 2015. 319 с.
5. Korf, Bruce R. Human Genetics and Genomics. 4-th edition. Wiley-Blackwell, 2013. 281 p.

Дякую за увагу!