**Глава 1**

   **Ме****тоды и маркёры**

##### Арсенал методов гистологии, эмбриологии и цитологии включает разнообразные (наряду с классической гистологической техникой) методы исследования структуры и функции клетки, применяемые в молекулярной и клеточной биологии. В этой главе дан краткий обзор этих методов и различных маркёров, применяемых для идентификации различных клеток.

**Гистологическая техника**

##### Основные типы материала для микроскопии — гистологические срезы (например, печени, лёгких), мазки (например, крови, красного костного мозга), сколы, смывы. Мазки подразделяют на мазки–отпечатки (например, слизистой оболочки щеки для определения телец Барра), ПАП–мазки (в гинекологической практике), сколы, смывы. В любом случае материал для исследования сначала фиксируют, затем обезвоживают, далее заливают в твёрдые среды, затем готовят срезы и производят окраску.

**ФИКСАЦИЯ**

##### Фиксация сохраняет структуру клеток, тканей и органов, предотвращает их бактериальное загрязнение и ферментное переваривание, стабилизирует макромолекулы путём их химического сшивания.

**Фиксирующая жидкость**

##### Быстрое проникновение химического фиксатора в живую ткань — условие сохранности структур *in situ*. Наиболее распространённые фиксаторы — формалин, спирты, глутаральдегид. Небольшие кусочки ткани фиксируют, помещая их в раствор фиксатора. Целые органы перед выделением перфузируют, т.е. прокачивают фиксатор через сосудистую систему органа.

**Криофиксация**

##### Лучшую сохранность структур обеспечивает мгновенное замораживание образцов в жидком азоте (–196 °C).

**Лиофилизация**

##### Материал как для световой, так и для электронной микроскопии подвергают быстрому замораживанию, прекращающему метаболические процессы. Последующее высушивание в вакууме вызывает возгонку льда. Метод позволяет исключить обработку ткани в промежуточных средах (обезвоживание и заливка).

**ОБЕЗВОЖИВАНИЕ**

##### Обезвоживание готовит фиксированную ткань к проникновению в неё сред для заливки. Вода живой ткани, а также вода фиксирующих смесей (большинство фиксаторов — водные растворы) после фиксации должна быть полностью удалена. Стандартная процедура удаления воды — обезвоживание в спиртах возрастающей от 60° до 100° крепости.

**ЗАЛИВКА**

##### Заливка — необходимая процедура, предваряющая приготовление срезов. Заливка делает ткань прочной, предотвращает её раздавливание и сминание при резании, даёт возможность получить тонкие срезы стандартной толщины. Наиболее распространённая среда для заливки — парафин. Используют также целлоидин, пластические среды и смолы.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ**

**Микротом**

##### Серийные и отдельные срезы различной толщины и площади для световой микроскопии готовят при помощи специального устройства — микротома (рис. 1-1). Различают санные и ротационные микротомы с ручной и электромеханической системой подачи ножа. Стальной нож микротома позволяет получить срезы толщиной 0,5–100 мкм из залитых в парафин, целлоидин или полиэтиленгликоль кусочков ткани. Приготовленные для последующей световой микроскопии срезы монтируют на предметное стекло.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image001.jpg

**Рис. 1-1. Ротационный микротом.** Блоки, содержащие кусочек органа, закрепляют в подвижном объектодержателе. При его опускании на ноже остаются серийные срезы, их снимают с ножа и монтируют на предметное стекло для последующей обработки и микроскопирования. [17]

**Криостат**

##### Если фиксация приводит к инактивации предполагаемых для изучения молекул (например,ферментов, биогенных аминов), используют микротом-криостат, позволяющий получить для световой микроскопии срезы толщиной 0,5–500 мкм из замороженной ткани в термически изолированной камере с низкой (до –35 °C) и регулируемой температурой. Криостаты широко применяются в приготовлении срезов для экстренной диагностики новообразований у больных в момент удаления опухоли. В криостатах последнего поколения предусмотрены независимая система охлаждения ткани и ножа, а также ручная или автоматическая система подачи образца.

**Ультратом (ультрамикротом)**

##### Автоматизированный прибор, позволяющий получать срезы из материала, залитого в смолу. При помощи стеклянных или алмазных ножей готовят ультратонкие срезы толщиной от 0,08–0,1 мкм (для электронной микроскопии) до 0,5 мкм (полутонкие срезы для световой микроскопии).

**Вибротом**

##### Микротом с вибрирующим лезвием для получения тонких срезов фиксированных и нефиксированных тканей без замораживания называется вибротом. Современные вибротомы имеют моторизованный режущий ход. Частота вибрации лезвия от 0 до 100 Гц позволяет получать срезы толщиной от 0,1 до 1500 мкм.

**Замораживание–скалывание**

##### Метод криосколов (замораживание–скалывание) применяют для изучения внутреннего строения клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота в присутствии криопротектора и используют для изготовления сколов. Плоскости скола проходят через гидрофобную середину двойного слоя липидов. Обнажённую внутреннюю поверхность мембран оттеняют платиной, полученные реплики изучают в сканирующем электронном микроскопе.

**Мазки и смывы**

##### Готовят для микроскопии высушиванием на предметном стекле либо кратковременной фиксацией.

**Интерпретация гистологических срезов**

##### К одним из наиболее сложных и трудоёмких навыков в гистологии относится умение интерпретировать получаемые на тех или иных срезах двухмерные (2D) изображения и создание на их основе представлений о трёхмерной (3D) структуре изучаемого объекта. Полную картину может дать суммирование и сопоставление многих (последовательных, или серийных) срезов объекта.

##### Определённые трудности возникают при распознавании по отдельным срезам изображения структур со сложной формой (полых, изогнутых, извитых, переплетённых и пр.) (рис. 1-2).

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image002.jpg

**Рис. 1-2. Соотношения между реальными трёхмерными структурами и их срезами, дающими двухмерные изображения**. На рисунке показаны различные сечения изогнутой трубчатой структуры (например, кишки). Стрелки указывают как отдельные элементы трёхмерного объекта представлены в двухмерном изображении на гистологическом препарате [49]

##### Ещё более затруднительной бывает интерпретация и анализ срезов не отдельной структуры, а органа, системы органов или целого организма (например, при исследованиях головного мозга, в биологии развития и т.п.). В связи с этим используют общепринятые направления срезов, или сечений (рис. 1-3).

######  Медиальное сечение — вертикальный срез, который проходит продольно через весь объект (например, тело эмбриона). Медиальное сечение делит тело на левую и правую половины. Термины латеральный и медиальный относятся к структурам, которые расположены соответственно дальше или ближе к плоскости медиального сечения.

######  Сагиттальный срез — любое вертикальное сечение, проходящее через тело и параллельное медиальному сечению. Своё название срезы получили по сагиттальному (стреловидному) шву черепа, которому эти срезы параллельны.

######  Поперечный (горизонтальный) срез — любой срез, проходящий под прямым углом как к медиальному, так и к фронтальному сечениям.

######  Коронарный (фронтальный) срез — любой вертикальный срез, который пересекает плоскость медиального сечения под прямым углом и разделяет объект на вентральную (anterior) и дорсальную (posterior) части. Своё название срезы (сечения) получили по коронарному (венечному) шву черепа, которому они параллельны.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image003.jpg

**Рис. 1-3 Направления сечений и используемые термины (на примере зародыша человека). А, Б —**вид спереди (вентральная сторона) 6-недельного эмбриона; **В —**вид сбоку (латеральная сторона) 7-недельного эмбриона. [150]

**ОКРАШИВАНИЕ СРЕЗОВ И МАЗКОВ**

##### Перед окрашиванием срезы депарафинируют и доводят до воды в спиртах нисходящей крепости, после чего стекло со срезами помещают в водный раствор красителя. Клеточные структуры, как правило, не различимы даже при большом увеличении микроскопа, они бесцветны и прозрачны. Для выявления тканевых компонентов, отдельных клеток и клеточных структур с 50‑х годов прошлого века используют красители — лиганды с высоким сродством к различным компонентам ткани и с определёнными цветооптическими свойствами. Способность тканевых компонентов по-разному окрашиваться зависит от кислотно-основных (щелочных) свойств веществ, входящих в их состав. Для электронной микроскопии материал контрастируют солями тяжёлых металлов, используют преимущественно цитрат свинца и уранилацетат.

**Кислые красители**

##### Эозин, конгорот, разные оранжи связываются со структурами или веществами, имеющими щелочную реакцию. Это — ацидофильные (основные) компоненты ткани [например, разные цитоплазматические белки (типичный пример — гемоглобин эритроцитов)].

##### Щелочные красители

##### Гематоксилин, метиленовый синий, толуидиновый синий, азур связываются с базофильными (кислыми) компонентами ткани (например, нуклеиновые кислоты ядра и рибосом).

**Стандартные красители**

##### Часто используют смеси кислых и щелочных красителей (например, гематоксилин + эозин). В гематологической практике мазки и срезы окрашивают специальными смесями (гематологические красители).

**ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

##### Гистохимические методы позволяют установить локализацию определённых веществ или биохимических процессов в тканевых и клеточных структурах. Для проведения гистохимической реакции обычно используют криостатные срезы, реже — срезы лиофилизированной ткани. О локализации исследуемого вещества судят по отложению окрашенного продукта реакции. Более высокого разрешения добиваются при электронной микроскопии (цитохимические методы). В этом случае применяют специальные методы подготовки объекта (криоультрамикротомия, замещение в замороженном состоянии, инертное обезвоживание и др.).

**Гистохимия** **ферментов**

##### В гистохимической практике ферменты подразделены на 6 главных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы). В ходе стандартной гистоферментной реакции срезы ткани помещают в раствор субстрата и специального вещества, способного образовать конечный продукт реакции в виде окрашенного осадка. Следует исключить возможность инактивации фермента и диффузию конечного продукта реакции.

##### Ферменты–маркёры характерны для некоторых органелл: кислая фосфатаза — лизосомы, сукцинатдегидрогеназа (СДГ) и цитохромоксидаза — митохондрии, глюкозо-6‑фосфатаза — шероховатая эндоплазматическая сеть, Ca2+-АТФаза — гладкая эндоплазматическая сеть.

##### В таблице 1-1 приведена сводка наиболее распространённых методов идентификации разных веществ, а на рисунке 1-3А результаты гистохимического выявления активности АТФазы миозина и сукцинатдегидрогеназы в разных типах скелетных мышечных волокон.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image004.jpg

**Рис. 1-3А. Типы волокон скелетной мышцы**. Гистохимическое выявление активности АТФазы миозина и сукцинатдегидрогеназы (СДГ). **A** (слева) — активность АТФазы миозина: тип I — медленносокращающиеся; II — быстросокращающиеся. **Б** (справа) — активность СДГ: А — белое (гликолитическое); B — промежуточное (окислительно–гликолитическое); C — красное (окислительное).

**Таблица 1-1. Гистохимическое выявление разных веществ**

|  |
| --- |
| **Определяемое вещество, реакция или выявляющий реактив** |
| **Нуклеиновые кислоты** |
|   | Реакция Фёльгена (реактив Шиффа–фуксин) |
|   | Акридиновый оранжевый (с ДНК флюоресценция жёлто-зелёного цвета, с РНК — красно-оранжевого) |
|   | Щелочные красители (толуидиновый синий, метиленовый синий, гематоксилин) |
| **Белки** |
| Гистоны и протамины | Прочный зелёный |
| **Аминокислоты** |
| Тирозин | Реакция Миллона |
| Аргинин | Реакция Сакагуши |
| Аминогруппы | Нафтоловый жёлтый |
| **Углеводы** |
| Поли- и олигосахариды | Реакция Шиффа с перйодной кислотой |
| Полисахариды | Рутениевый красный |
| Гликозаминогликаны | Альциановый синий |
| **‑**D–глюкоза и **‑**D–манноза | Конканавалин А |
| N–Ацетилглюкозамин | Агглютинин из зародышей пшеницы |
| Фукоза | Лектин из семян лотоса |
| **‑**Галактоза | Агглютинин земляного ореха, лектин из сои |
| **Липиды** |
|   | Проционовый жёлтый, суданы |
|  |  |  |

**Иммуногистохимия**

##### Принцип проведения иммуногистохимической реакции основан на специфическом взаимодействии меченых антител (АТ) с тканевыми антигенами (Аг). АТ метят различными способами: флюорохромами (флюоресцеин, родамин и др.), ферментами (пероксидаза хрена), биотином, радиоизотопами или электроноплотными частицами (ферритин, коллоидное золото). Применяют два варианта иммуногистохимических реакций: прямой (рис. 1-4А) и непрямой (рис. 1-4Б). В качестве примеров смотрите также микрофотографии, на которых представлены результаты избирательного выявления ядрышек в клетках культуры (рис. 1-4В), гонадотрофина в плаценте (рис. 1-4Д) париетальных клеток в слизистой оболочке желудка (рис. 1-4Е), инсулина и глюкагона в островках Лангерханса поджелудочной железы (рис. 1-4Ж), Аг базальной мембраны капиллярных клубочков почки (рис. 1-4И, нефрина — компонента фильтрационного барьера почечных телец (рис. 1-4К). При использовании двойной метки (разные АТ, конъюгированные с различными флюорохромами) можно наблюдать на одном срезе взаимное расположение разных структур; так, на рисунке 1-4Г показаны и митохондрии, и микротрубочки.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image005.jpg

**Рис. 1-4. Иммуноцитохимическая реакция**. **А**. Прямой метод предполагает использование меченых АТ против интересующего Аг. АТ взаимодействуют с Аг в местах их локализации. Эти места выявляют при помощи метки, связанной с АТ. **Б**. Непрямой метод предполагает использование двух различных АТ. Первые АТ реагируют с Аг ткани. Связанные с меткой вторые АТ специфически взаимодействуют с первыми АТ, которые для вторых АТ являются Аг. Метод значительно чувствительнее прямого, т.к. с каждой молекулой первых АТ связывается несколько молекул вторых АТ, содержащих метку (например, пероксидазу). [17]

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image006.jpg

**Рис. 1-4В. Ядрышки** флюоресцируют зелёным цветом. Клетки Hep2 *in vitro*, антиядерные АТ к т.н. ядерным Аг характерным образом окрашивают разные структуры в составе ядра при системной красной волчанке, ряде системных коллагеновых заболеваний.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image007.jpg

**Рис. 1-4Г. Фибробласт**. Иммунофлюоресцентным методом выявлены митохондрии (зелёное свечение) и микротрубочки (красное свечение). Митохондрии окрашены при помощи первых АТ к СЕ F1 АТФазы и связанных с родамином вторых АТ. Микротрубочки выявлены при помощи АТ против тубулина.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image008.jpg

**Рис. 1-4Д. Плацента**. Непрямым иммуногистохимическим методом при помощи АТ к хорионическому гонадотропину (ХГТ) выявлен источник ХГТ в плаценте: осадок коричневого цвета соответствует локализации синцитиотрофобласта.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image009.jpg

**Рис. 1-4Е. Париетальные клетки** в слизистой оболочке фундального отдела желудка. Иммунофлюоресцентным методом окрашены париетальные клетки (зелёное свечение) фундальных желёз желудка.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image010.jpg

**Рис. 1-4Ж. Островок Лангерханса поджелудочной железы**. Иммунопероксидазное выявление различных клеточных типов при помощи АТ против гормонов. Слева: осадок реакции коричневого цвета соответствует локализации альфа-клеток. Справа: окрашены бета-клетки.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image011.jpg

**Рис. 1-4И. Капиллярный клубочек**. Иммунофлюоресцентный метод позволил окрасить в эелёный цвет один из компонентов базальной мембраны капиллярного клубочка.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image012.jpg

**Рис. 1-4К. Почечное тельце**. Иммунофлюоресцентным методом при помощи АТ против нефрина выявлены подоциты (яркое зелёное свечение).

**Метод выявления апоптозных клеток (TUNEL-метод)**

##### TUNEL–метод (Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) основан на выявлении 3’-ОН концов в молекуле ядерной ДНК, образующихся при её фрагментации в клетках, вступивших в апоптоз. 3'-Урацил, конъюгированный с биотином, с помощью терминальной дезоксинуклеотидил трансферазы (TdT) включается в фрагменты ДНК. Далее биотинилированный нуклеотид выявляют с помощью стрептавидина, меченного пероксидазой хрена [стрептавидин–биотиновый метод, основанный на высокой аффинности (сродстве) биотина к стрептавидину].

**Микроскопия**

**СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ**

**Микроскоп**

##### Увеличение — физическое свойство линз объектива и окуляра. Увеличение микроскопа приблизительно оценивают как произведение увеличения объектива и увеличения окуляра (рис. 1-5).

##### Минимальный размер *d* наблюдаемого объекта определён формулой:

##### *d*https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image013.gif,

где:  — половина угловой ширины конуса световых лучей, собираемых линзами объектива; *n* — коэффициент преломления среды, отделяющей изучаемый объект от линз объектива или конденсора;  — длина волны света. *nSin* — апертура.

##### Разрешение микроскопа — величина, обратная *d*. Чем больше апертура, тем выше разрешение, но при этом уменьшается глубина резкости. Повысить разрешение можно за счёт увеличения апертуры. Увеличить апертуру можно путём увеличения коэффициента преломления. Коэффициент преломления жидких сред (иммерсионные среды) больше коэффициента преломления воздуха (*n*= 1,0). В микроскопии используют несколько иммерсионных сред: масляную, глицериновую, водную.

##### Предел разрешения светового микроскопа определяется длиной световой волны и апертурой линз. Теоретически возможный предел разрешения светового микроскопа — 0,2 мкм (минимальное расстояние, на котором различимы два объекта).

##### Оптические артефакты. Объектив состоит из нескольких стеклянных линз. Первая линза — сферическая или полусферическая — предназначена для получения увеличенного изображения. Все остальные линзы корригируют оптические артефакты (аберрации).

######  Хроматические аберрации. Фокусное расстояние линзы для лучей разной длины волны различно. Поэтому при использовании немонохроматического света формируемое линзой изображение предмета имеет окрашенные края. Хроматические аберрации устраняют ахроматические и апохроматические объективы.

######  Сферические аберрации. Различие оптических свойств центральной и периферической частей сферической линзы — причина сферических аберраций. Их устраняют апохроматические объективы. Сферическая линза не позволяет одновременно фокусировать изображение по всему полю. Для устранения этого недостатка применяют специальные объективы — планахроматы и планапохроматы. Наилучшим объективом считают планапохромат с высокой числовой апертурой.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image014.jpg

**Рис. 1-5. Микроскоп**. Этот оптический прибор позволяет наблюдать мелкие объекты. Увеличение изображения достигается системой линз объектива и окуляра. Зеркало, конденсор и диафрагма направляют световой поток и регулируют освещение объекта. Механическая часть микроскопа включает: штатив, предметный столик, макро- и микрометрический винты, тубус, тубусодержатель. [17]

**Специальные виды микроскопии**

##### Темнопольная микроскопия. Используют специальный конденсор, выделяющий контрастирующие структуры неокрашенного материала. Темнопольная микроскопия позволяет наблюдать живые объекты. Наблюдаемый объект выглядит как освещённый на тёмном поле. При этом лучи от осветителя падают на объект сбоку, а в линзы микроскопа поступают только рассеянные лучи.

##### Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые и неокрашенные объекты. При прохождении света через окрашенные объекты изменяется амплитуда световой волны, а при прохождении света через неокрашенные — фаза световой волны, что и используют для получения высококонтрастного изображения в фазово-контрастной и интерференционной микроскопии.

##### Поляризационная микроскопия — формирование изображения неокрашенных анизотропных структур (например, коллагеновые волокна и миофибриллы).

##### Интерференционная микроскопия объединяет принципы фазово-контрастной и поляризационной микроскопии и применяется для получения контрастного изображения неокрашенных объектов. Специальная интерференционная оптика (оптика Номарского) нашла применение в микроскопах с дифференциальным интерференционным контрастом.

##### Люминесцентная микроскопия применяется для наблюдения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов. В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два фильтра. Один фильтр задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флюоресценцию образца. Другой фильтр пропускает свет длины волны, излучаемой флюоресцирующим объектом. Таким образом, флюоресцирующие объекты поглощают свет одной длины волны и излучают в другой области спектра.

######  Катехоловые амины. Объект может флюоресцировать после специальной обработки ткани. Так, катехоламины, включая адреналин и норадреналин, флюоресцируют после обработки ткани в парах параформальдегида при 60–80 °C. Метод разработан группой шведских учёных и известен как метод Фалька.

######  Флюоресцирующие красители (флюоресцеин, родамин и др.) избирательно связываются со специфическими макромолекулами.

##### Сканирующий ближнепольный оптический микроскоп. В основе работы сканирующего ближнепольного оптического микроскопа лежит использование светового луча, диаметр которого меньше, чем длина волны источника, вследствие чего предел разрешения у такого микроскопа фактически отсутствует. Свет пропускают через субволновую диафрагму (отверстие с диаметром меньшим, чем длина волны используемого излучения). Исследуемый объект размещается непосредственно за отверстием в ближней зоне. Источник субдлинноволнового света размещают на расстоянии 10 нм и менее над объектом. Перемещая исследуемый объект или источник света (диафрагму с субволновым отверстием) в горизонтальном направлении, получают ближнепольное изображение поверхности образца, регистрируемое в виде распределения интенсивности оптического излучения в зависимости от положения диафрагмы. В качестве источника субдлинноволнового света обычно используют зонд, изготовленный путём растягивания расплавленного оптического волокна (плавленно–тянутый зонд), травления и др.; конусовидное остриё зонда покрывают металлом (например, алюминием с помощью его испарения). В источниках света используют мелкие люминесцирующие частицы (бусина размером 10 нм, размещённая на конце зонда, люминесцирующая под воздействием ультрафиолетового облучения). В этом случае прохождение света через объект регистрируют с помощью детектора, покрытого поглощающим ультрафиолет слоем.

**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ**

**Просвечивающий электронный микроскоп**

##### В просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) вместо света применяют пучок электронов (рис. 1-6). При создаваемой высокой разности потенциалов (ускоряющем напряжении 50−600 кВ) электроны, составляющие пучок, имеют очень малую длину волны, что позволяет получать изображение изучаемого объекта с высоким разрешением. Теоретически разрешение просвечивающего электронного микроскопа составляет 0,002 нм. Реальное разрешение современных микроскопов приближается к 0,1 нм. Для биологических объектов разрешение ПЭМ на практике составляет 2 нм.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image015.jpg

**Рис. 1-6. Просвечивающий электронный микроскоп**. [120]

##### В качестве источника электронов используют термоионные электронные пушки или пушки автоэлектронной эмиссии. При этом источник должен обладать небольшими размерами и высокой мощностью, чтобы получить изображение образца достаточно ярким. Изучаемый образец устанавливают на сетчатой подложке. Сетчатые подложки для ПЭМ не должны электризоваться, иначе это может исказить траекторию электрона. Обычно подложки изготавливают из проводящих химически инертных и не испаряющихся в вакууме материалов, таких, как вольфрам, молибден, нержавеющая сталь, титан, серебро, платина, платино-иридиевые сплавы.

##### Электроны, испускаемые пушкой в виде пучка с высокой энергией, проходят в вакууме через систему комбинированных фокусирующих электронных линз. Комбинированные линзы состоят из магнитных и электростатических линз, которые обеспечивают упорядоченное движение электронов в пучке (по спирали) и уменьшают диаметр пучка. Прежде чем провзаимодействовать с изучаемым объектом, пучок замедляется, а далее проходит сквозь объект. Прошедший сквозь объект луч с помощью линз проецируется на люминесцирующий экран, на котором создаётся видимое увеличенное изображение объекта. Изображение регистрируют различными детекторами.

##### Электронная томография. Этим методом с помощью серии микрографий, сделанных под разными углами, можно получить суммарную картину трёхмерной структуры исследуемого объекта (например, клеточных органелл).

**Сканирующий просвечивающий электронный микроскоп**

##### С помощью сканирующего просвечивающего электронного микроскопа изучают структуру поверхности объекта, сканируя её с помощью тонкого электронного луча (диаметром в несколько ангстрем). Микроскоп даёт возможность изучать молекулы при субнанометровом разрешении.

##### В ходе исследования электронный луч фокусируется на небольшом участке объекта. Передвигая сфокусированный луч над объектом, получают общую картину изучаемой поверхности. Для улучшения разрешения применяют различную технику энергетического фильтрования электронов.

**Сканирующая зондовая микроскопия**

##### Сканирующие зондовые микроскопы позволяют получить изображение исследуемого объекта при его сканировании с помощью микроскопических игл  зондов, имеющих очень острые окончания. Зонды могут быть различными: механическими, электрическими, оптическими, тепловыми и проч. К сканирующим зондовым микроскопам относятся атомно-силовой микроскоп, сканирующий туннельный микроскоп, сканирующий ближнепольный оптический микроскоп, сканирующий тепловой микроскоп, сканирующий ионную проводимость микроскоп и др.

**Атомно–силовой микроскоп**

##### Атомно–силовая микроскопия позволяет получать трёхмерные изображения профилей поверхностей биологических объектов в нанометровом масштабе. С помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) можно исследовать размеры и конформацию как единичных молекул, так и их конгломератов, фиксированных к твёрдым поверхностям. С помощью АСМ можно манипулировать отдельными молекулами (например, перемещать их с места на место). В основе работы АСМ лежит сканирование поверхности изучаемого объекта с помощью тончайшего зонда (иглы). Диаметр окончаний зондов составляет обычно 1020 нм. Зонд закреплён на свободном конце выступающего кронштейна (кантилевера) (рис. 1-7). В ходе сканирования поверхности кантилевер изгибается. При этом между объектом и остриём зонда возникают небольшие силы взаимодействия [несколько пиконьютонов (пН) или наноньютонов (нН)]. Оптическая система, состоящая из диодного лазера и диодной линейки, весьма чувствительна к изгибам кантилевера. При перемещениях кантилевера силы взаимодействия изменяются, что проявляется в изменениях отражения лазерного луча. Перемещая образец под остриём зонда или зонд над образцом, получают полное изображение рельефа поверхности образца. Точность измерений достигает нескольких ангстрем. Атомно-силовой микроскоп способен выявлять рельеф образца с субнанометровым разрешением.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image016.jpg

**Рис. 1-7. Атомно-силовой микроскоп**. Очень тонкое остриё, прикреплённое к миниатюрному кантилеверу, зондирует поверхность исследуемого объекта. Для сканирования поверхности образец перемещается с помощью пьезоэлектрического манипулятора. [120]

**Сканирующий туннельный микроскоп**

##### Сканирующие туннельные микроскопы позволяют изучать структуру поверхности образца с разрешающей способностью до отдельных атомов. В основе работы микроскопа лежит использование т.н. туннельного эффекта. В его основе лежит явление прохождения электронов через барьер, образованный разрывом электрической цепи, — очень малым расстоянием (туннельным зазором), создаваемым между остриём зонда и электропроводящей поверхностью исследуемого объекта (рис. 1-8, рис. 1-9). При исследовании мягкого биологического материала образец должен быть жёстко фиксирован на проводящем субстрате (например, молекула ДНК на кристалле золота). Для появления туннельного тока (туннелирования электронов) расстояние между остриём зонда и проводящим образцом должно составлять доли нанометра, а прикладываемое между ними напряжение — от единиц милливольт до вольт. При исследовании образца замеряется локальная плотность электронов в туннельном токе. Ток зависит также от химической природы зонда и образца, что даёт возможность исследовать электронные свойства изучаемого объекта.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image017.jpg

**Рис. 1-8. Принцип действия сканирующего туннельного микроскопа**. Токопроводящее остриё зонда сначала приближают к образцу на расстояние около 1 нм. На таком близком расстоянии электроны туннелируют сквозь щель между острием и объектом. [120]

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image018.jpg

**Рис. 1-9. Возникновение туннельного эффекта (туннелирование электронов**). При уменьшении расстояния между остриём зонда и проводящим изучаемым объектом до нескольких ангстрем электроны могут преодолевать это расстояние. [120]

**ДРУГИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

**Лазерная конфокальная микроскопия**

##### Метод конфокальной сканирующей микроскопии позволяет получить оптические срезы путём послойного сканирования объектов по глубине (наподобие томографии) и производить пространственную реконструкцию флюоресцирующего объекта. Условие конфокальности, совпадение [фокусов](http://phys.web.ru/db/search.html?not_mid=1182209&words=%F4%EE%EA%F3%F1%EE%E2) диафрагмы детектора и освещающего объект света, выполняется, если один и тот же объектив используется и для освещения объекта, и для детекции изображения. Другим важным условием этого метода является применение диафрагмы детектора с минимальным диаметром, что требует использование мощного источника света, а именно систему лазеров. Большое количество шаговых двигателей управляют положением объекта в фокусе конфокального микроскопа как в плоскости XY, так и по оси Z. Конфокальный микроскоп управляется от компьютера, а изображение объекта можно увидеть только на дисплее. Каждый оптический срез запоминается как отдельный файл, после чего с помощью программы воссоздается трёхмерное изображение объекта.

**Рентгеновская микроскопия**

##### Предел разрешения рентгеновского микроскопа (~30 нм) на 2–3 порядка выше, чем светового (~200 нм), поскольку длина волны  рентгеновского излучения на 2–3 порядка меньше длины волны видимого света. Как видно, по разрешающей способности рентгеновский микроскоп занимает промежуточное положение между световым и электронным микроскопом. Кроме высокого разрешения рентгеновская микроскопия имеет и другие важные преимущества: возможность исследовать необезвоженный (гидратированный) объект, работать с достаточно толстыми срезами до 10 мкм, получать высококонтрастное изображение без окраски, работать при атмосферном давлении, а не в вакууме, как в случае электронной микроскопии, что существенно упрощает конструкцию микроскопа, т.к. позволяет обойтись без сложной вакуумной техники. В рентгеновской микроскопии для фокусировки рентгеновских лучей используют явление их отражения изогнутыми зеркальными плоскостями или отражение от кристаллографических изогнутых плоскостей. В рентгеновском микроскопе, в отличие от электронного микроскопа, не используют электрические и магнитные линзы, т.к. как рентгеновские лучи инертны к электрическому и магнитному полям.

**СИСТЕМЫ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ**

##### Прогресс компьютерных технологий позволил автоматически обрабатывать и анализировать изображения клеточных и тканевых структур, быстро сосчитывать однотипные морфологические элементы, оценивать размеры клеток и субклеточных структур.

##### Анализатор изображений включает микроскоп, цифровую или телевизионную систему ввода изображения (захват изображения, экспорт/импорт изображений в формате \*.img, \*.jpg, \*.bmp, чёрно-белые изображения 8 бит, цветные 24 бит), компьютер и программное обеспечение. Система анализа изображения в реальном времени осуществляет статистическую обработку исследуемого объекта по интересующим параметрам, позволяет сохранять изображения микропрепаратов и результаты анализа в базе данных.

##### ****Морфометрические исследования.****Автоматический анализ морфометрических параметров: площадь, периметр, диаметр, длина, ширина, факторы формы, габариты, координаты.

##### ****Фотометрия (денситометрия)****  фотометрический анализ объектов по интенсивности яркости свечения или оптической плотности исследуемой структуры.

##### ****Хромосомный анализ**** позволяет проводить кариотипирование в ручном или автоматическом режимах, анализировать кариограммы и формировать заключение, сохранять полученные изображения в базе данных.

##### Автоматизированный анализ мазка крови. В объёме стандартного клинического анализа в мазке крови автоматически подсчитываются лейкоцитарная формула, число тромбоцитов в расчете на тысячу эритроцитов, оценивается анизоцитоз и пойкилоцитоз, строится эритрометрическая кривая (кривая Прайса–Джонса  распределение эритроцитов по размеру диаметра и количеству). В зависимости от характеристик анализатора изображений пропускная способность системы варьирует от 20 до 30 мазков крови в час.

##### А****нализ движения**** в клеточной культуре включает измерения скорости, расстояния и направления движения клеток и их отростков. Анализатор изображения должен включать СО2 камеру, в которую помещается посуда с исследуемыми клетками, а также высокочувствительную телевизионную камеру, позволяющую проводить видеосъёмку в полной темноте.

##### ****Анализ морфологии и подвижности сперматозоидов**.** В образце нативного эякулята автоматически определяется количество сперматозоидов и оценивается их подвижность. На окрашенных мазках эякулята оцениваются морфометрические параметры сперматозоидов.

##### ****Анализ колоний бактерий****  подсчёт и морфометрия колоний, статистическая обработка, сохранение изображений и результатов анализа в базе данных.

##### Виртуальный препарат создаётся автоматически из нескольких полей зрения микроскопа чтобы получить изображение гистологического препарата, который не помещается в одном поле зрения, и последующем изучении с имитацией перемещения по препарату. Захват изображения ведётся при максимальном увеличении микроскопа, что увеличивает возможности изучения препарата на мониторе компьютера.

##### Телемедицинская станция. Анализатор изображений может быть интегрирован в локальную, региональную или федеральную информационную систему, а полученное изображение микропрепарата отправлено на другую систему анализа изображения, например для удалённой консультации. Интеграция индивидуального анализатора изображений в федеральную информационную систему позволяет передавать в базу данных для хранения собственные оцифрованные микропрепараты и обратно из базы получать изображения и информацию для диагностики микропрепаратов.

**Методы работы с клетками**

**КЛЕТОЧНАЯ, ТКАНЕВАЯ И ОРГАННАЯ КУЛЬТУРЫ**

##### Методы культивирования применяют для исследования функции изолированных живых клеток и тканей вне влияния регуляторных механизмов целостного организма. Следует помнить, что ситуации *in vivo* и *in vitro* не идентичны, клетки и ткани проявляют в этих состояниях различные свойства и по-разному реагируют на одинаковые воздействия.

##### В условиях культуры производят отбор клеток определенного типа или определённой структуры с помощью селективных питательных сред, гибридизацию клеток с последующим анализом гибридов и др. Соматические клетки млекопитающих в культуре достаточно быстро размножаются, время удвоения их числа может составлять 12–14 ч. Поэтому в культуре клеток представляется возможным регистрировать редкие генетические события, такие как мутации и образование гибридов, изучать закономерности мутационного процесса, картирование генов в хромосомах и в первую очередь картирование хромосом у человека, закономерности действия генов и регуляции их активности. Культуру соматических клеток широко используют для изучения молекулярных основ естественного и искусственного мутагенеза. Именно в культуре была показана возможность получения в клетках индуцированных мутаций под влиянием различных внешних факторов, установлена связь между мутагенностью и канцерогенностью различных веществ и вирусов и произведена оценка степени опасности химических и физических агентов для наследственности человека.

**Клеточная** **культура**

##### Клеточная культура содержит суспензию клеток или клетки, прикрепившиеся к субстрату. Культивирование проводят в стеклянной или пластиковой посуде, поверхность которой предварительно покрывают желатином, полилизином, коллагеном и другими компонентами внеклеточного матрикса. Культивируемые клетки формируют монослой или отдельные клеточные колонии — клоны. Культивирование проводят в атмосфере строго определённого газового состава в специальном устройстве — CO2-инкубаторе. Питательная среда для культивирования содержит аминокислоты, витамины, гормоны, факторы роста, углеводы, антибактериальные и антигрибковые препараты и другие добавки на буферном изотоническом солевом растворе.

##### Получение клеточных культур. Кусочки ткани измельчают, обрабатывают гидролитическими ферментами (трипсин, коллагеназа, гиалуронидаза и др.), после чего клетки могут быть разделены в зависимости от их размеров и массы путём центрифугирования. Для сортировки клеток используют помеченные флюоресцирующими веществами АТ, которые избирательно связываются с Аг, специфичными для определённых клеточных типов. Используемое для этой цели устройство называют сортер (см. ниже).

##### Клеточная линия. Клетки, полученные для культивирования из ткани или органа, сначала составляют небольшую популяцию — первичная культура. При длительном культивировании и многочисленных пересевах из первичной культуры может быть получена клеточная линия — клетки, способные многократно размножаться. Линии трансформированных клеток неопределённо долго хранятся в жидком азоте, их в любое время можно использовать для получения клеточных культур и проведения различных исследований.

**Клеточная инженерия**

##### Одним из основных методов биотехнологии является клеточная инженерия  конструирование клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. Клеточная и тканевая инженерия направлены на решение научных и практических задач  манипуляция с полученными в лабораторных условиях молекулами, клетками, тканями и органами для замены или поддержания функции поврежденных частей организма. Развитию клеточной инженерии способствовало освоение техники оплодотворения *in vitro* и создание клонированных животных, разработка технологии трансплантации эмбрионов и методов микроманипуляций с ними. В 1996 году шотландским учёным из Эдинбурга впервые удалось получить овцу из энуклеированной яйцеклетки, в которую было пересажено ядро соматической клетки (вымени) взрослого животного. Эта работа открыла широкие перспективы в области клонирования животных и встраивания в их геном различных генов, в том числе генов человека.

##### Гибридизация соматических клеток. В основе метода лежит слияние соматических клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далёким в систематическом отношении организмам. Для получения гибридных клеток применяют специальные методики (обработка клеток инактивированным вирусом Сендай, использование селективных сред, на которых погибают родительские клетки, а гибридные клетки выживают и др.). После слияния новая клетка временно содержит двойной набор хромосом, который постепенно редуцируется за счет случайной утери мышиных или человеческих хромосом. Оставшиеся хромосомы могут быть идентифицированы морфологически или путем использования специальных методов окраски. Гибридные клетки в культуре могут быть протестированы на предмет наличия конкретных продуктов генов. Наличие или дефицит этих продуктов прямо коррелирует с наличием или отсутствием конкретных хромосом.

##### Межвидовая гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека, в анализе причин злокачественного перерождения клеток. Гибридизацию клеток млекопитающих используют также для изучения действия генов. В частности, метод гибридизации клеток нашел применение для установления в геноме млекопитающих регуляторных генов, контролирующих работу структурных генов.

######  Гетерокарион (от греч. *heteros* — другой и *karyon* — ядро) — клетка с двумя или более ядрами, сформированная в результате экспериментального слияния двух или более генетически различных клеток. Английский ученый Г. Харрис в 1965 году впервые получил гетерокарионы, образованные клетками мыши и человека. Присутствие в гетерокарионе ядер разных типов может нивелировать присущие тому или иному типу биохимические дефекты. Так, в гетерокарионе, образованном при слиянии клеток больных с синдромами Хюрлер и Хантера, характеризующихся нарушением обмена гликозаминогликанов, нормализуется их метаболизм, т.к. при этих синдромах дефектны различные белки, участвующие в обмене гликозаминогликанов.

######  Гибридома. При слиянии нормальной клетки с опухолевой получают гибридому. Клетки гибридомы обладают способностью к синтезу специфического белка (свойство нормальной клетки) и неограниченному росту (свойство опухолевой клетки). В результате подобная гибридома за сравнительно короткий срок накапливает большое количество специфического белка (моноклональные антитела, гормоны, факторы роста, факторы свертывания крови, нейротрофические факторы и др.), который может быть выделен и использован для диагностики и лечения различных заболеваний.

##### Реконструкция клеток. Предполагает слияние клеточных фрагментов между собой или с неповрежденными клетками. Путем реконструкции получают клетки с различными свойствами, либо клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра. Одним из наиболее распространенных способов модификации клеток является введение в них индивидуальных генов, т.е. метод генетической инженерии. Встраивание активного гена на место отсутствующего или поврежденного открывает путь для лечения наследственных болезней. В общем виде протокол подобного лечения выглядит следующим образом: 1) выделение клеток из организма больного; 2) использование методов генной инженерии для встраивания в клетки недефектных генов с тем, чтобы эти клетки приобрели способность экспрессировать нужные белки; 3) трансплантация клеток с модифицированным геномом в организм больного.

**Тканевая** **и** **органная** **культуры**

##### Культивируют фрагменты тканей или органов. Метод часто используют для исследования механизмов эмбриональной дифференцировки и морфогенеза.

**РАДИОАВТОГРАФИЯ**

##### Метод позволяет судить о синтезе различных макромолекул в субклеточных структурах (табл. 1-2). В среду обитания клеток *in vivo* или *in vitro* вводят радиоактивный предшественник синтеза макромолекул. Радиоактивность поглотившей метку структуры регистрируют по восстановлению зёрен серебра в покрывающей препарат фотоэмульсии.

**Таблица 1-2. Радиоавтографическое выявление некоторых веществ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Определяемое вещество** | **Изотоп и предшественник** |
| ДНК | 3H–тимидин, 14C–тимидин |
| РНК | 3H–уридин, 3H–цитидин |
| Белок | 35S–меченые аминокислоты |

**ЦИТОФОТОМЕТРИЯ**

##### Методы цитофотометрии предназначен для количественного определения различных веществ и их локализации в клетке по характеристическому поглощению этими веществами света определённого спектра. Цитофотометрию проводят в ультрафиолетовом, видимом, инфракрасном, рентгеновском диапазонах и применяют для определения количества нуклеиновых кислот, белка, активности ряда ферментов, поэлементного анализа химического состава клеток.

**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ. СОРТИРОВКА КЛЕТОК**

##### Сортировка клеток методом проточной цитометрии осуществляется по критерию связывания с ними флюоресцентных красителей (меток). Каждый клеточный тип характеризуется определенным набором специфических белков (антигенов) на своей поверхности. С этими антигенами избирательно связываются антитела, конъюгированные с различными флюоресцентными метками. Подобные метки, таким образом, обозначают присутствие конкретного антигена на поверхности интересующей клетки.

**Проточный цитофлуориметр (лазерный сортер клеток)**

##### Клеточные популяции идентифицируют по рассеиванию лучей лазера, проходящих через поток клеток в капилляре цитофлюориметра. По заданным параметрам светорассеяния и флюоресценции меченые клетки в составе отдельных капель получают отрицательный электрический заряд, по которому капли с клетками автоматически распределяются в специальные среды с нейтральным, положительным или отрицательным зарядом (рис. 1-10). Скорость сортировки составляет более 70 000 клеток в секунду с одновременным измерением более 30 параметров и чистотой выхода более 99%. В современных высокопроизводительных лазерных сортерах применены новейшие достижения в электронике, оптике и гидравлике. В них уменьшена турбулентность и минимизировано отрицательное воздействие ускорения на клетки.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image019.jpg

**Рис. 1-10. Сортировка клеток методом проточной цитометрии**. В культуральной среде специфические АТ, конъюгированные с флюоресцентным зондом, связываются с Аг на поверхности клеток, например, с CD34+на мембране стволовой кроветворной клетки. Под давлением клетки проходят по капилляру, где меченые CD34+клетки под действием лучей лазера получают отрицательный электрический заряд. В электрическом поле происходит разделение клеток, несущих положительный или отрицательный заряд. [143]

**Применение лазерного сортера**

##### Отсортированные клетки сохраняют жизнеспособность и функциональные свойства, что позволяет их длительно культивировать и исследовать *in vivo*, а также использовать для клинической трансплантации. Метод позволяет идентифицировать минорные популяции клеток, что важно, например, для выделения стволовых клеток. Клеточный сортер имеет широкий спектр приложений в биологии и медицине и незаменим для решения таких задач, как анализ переноса энергии флюоресцентного резонанса, работа с флюоресценцией протеинов, исследование органелл, антигенов, рецепторов, апоптоза, потока кальция, мембранного потенциала, молекулярных механизмов передачи сигнала, а также для сортировки стволовых клеток, спермы и других минорных популяций.

##### Сортировка стволовых клеток. Одна из наиболее значимых областей для использования клеточного сортера — биология стволовых клеток и их применение в клинической трансплантологии. Так, при получении из крови стволовых кроветворных клеток для последующей трансплантации их количество составляет по разным оценкам от 0,01% до 1% лейкоцитов. Для решения сложной задачи выделения этих клеток используют высокоэффективную сортировку на основе мультипараметрического иммунофенотипирования, т.е. осуществляют отбор клеток не по одному, а по нескольким признакам одновременно. В этом направлении в настоящее время проводятся активные исследования стволовых клеток с целью уточнения мембранных маркёров, морфо-функциональных характеристик и способности клеток приживляться в организме реципиента.

**Молекулярные методы исследования**

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА**

**Иммуноблот**

##### С помощью иммуноблота (вестерн-блот, Western blot) выполняют качественный и количественный анализ белков-мишеней. Принцип метода основан на специфическом взаимодействии первичных АТ с искомым белком. Денатурированный белковый экстракт из исследуемого образца разделяют с помощью электрофореза в градиентном (4–16%) додецилсульфат натрия–полиакриламидном геле (SDS–PAGE). Разделённые по молекулярной массе белки путём электрофореза из геля переносят на микропористую нитроцеллюлозную мембрану (блотинг). После чего белки-мишени выявляют с помощью специфических АТ непрямым иммунопероксидазным методом.

**Твёрдофазный иммуноферментный анализ**

##### По своему принципу твёрдофазный иммуноферментный анализ ЕLISА (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) напоминает вестерн-блотинг, содержание белка-мишени в белковом экстракте определяют с помощью специфических АТ. В ЕLISА используется твёрдая полимерная матрица (96 луночный полистироловый планшет), на которой предварительно иммобилизуются АТ против белка-мишени. Иммобилизация АТ на матрице осуществляется либо путём их ковалентной «пришивки», либо путём их физической адсорбции на твёрдом носителе в результате электростатического и ван-дер-ваальсового взаимодействия.

##### Конкурентный иммуноферментный анализ. АТ связывают со стенками лунки на полистироловом планшете. Исследуемый материал (например, сыворотка, смыв, белковый экстракт) из исследуемого материала, содержащий искомый белок (антиген, Аг) в неизвестной концентрации, смешивают с определенным количеством меченого белка-мишени и вносят в лунки полистиролового планшета. Аг в белковом экстракте и меченный Аг конкурентно связываются с АТ, фиксированными на стенке лунок. После этого меченный Аг выявляют иммунопероксидазным методом и с помощью специального спектрального прибора определяют активность пероксидазы хрена, которая будет обратно пропорциональна концентрации Аг в исследуемом материале.

##### Неконкурентный иммуноферментный анализ (метод сэндвича). Первые АТ против белка-мишени иммобилизируют на стенках лунок полистиролового планшета. Затем добавляют исследуемый материал и через определённое время вносят вторые меченные АТ против белка-мишени. Вторые АТ выявляют иммунопероксидазным методом и определяют активность фермента, которая будет линейно зависеть от количества искомого белка в данном образце.

**Хромофор-опосредованная лазерная инактивация белков**

##### Излучение лазера на красителях с длиной волны 620 нм фокусируют при помощи оптики микроскопа в виде пятна диаметром 10 мкм. Предварительно ткань обрабатывают АТ, связанными с красителем (хромофором) малахитовым зеленым. АТ избирательно взаимодействуют с белком-мишенью. В результате в непосредственной близости с этим белком оказывается краситель, который аккумулирует энергию лазерного излучения. При этом образуются короткоживущие и повреждающие белок гидроксильные радикалы. Методика позволяет избирательно блокировать функцию конкретных белков в клетке и таким образом устанавливать их роль. При выключении подобным образом функции тех или иных белков оказывается возможным наблюдать поведение клеток в реальном времени. Особенно перспективным представляется использование данного метода для описания функции белков, связанных с цитоскелетом, молекулярными моторами, удлинением частей клетки, образованием их отростков, например, формированием конуса роста аксона, а также роли интегральных и периферических мембранных белков.

**МЕТОДЫ ГЕННОГО ЗОНДИРОВАНИЯ**

##### Генное зондирование позволяет выявить специфические нуклеотидные последовательности ДНК и РНК в исследуемом объекте (биологическая жидкость, биопсия, гистологический срез, мазок). В основе метода лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации по правилу Уотсона–Крика (A-T и G-C), т.е. к комплементарному спариванию нуклеотидов искомой ДНК (или РНК) с олигонуклеотидным зондом, имеющим специфическую последовательность оснований. В состав зонда во время синтеза олигонуклеотида вводят специальную метку (радиоактивные изотопы, флюоресцеины, биотин), позволяющую обнаружить образующиеся двухцепочечные комплексы.

**Саузерн-блот (Southern blot)**

##### С помощью ДНК–зонда производят поиск идентичных участков ДНК в исследуемом образце. Пробы ДНК обрабатывают рестрицирующими нуклеазами, а полученные фрагменты ДНК разделяют по размеру (пар нуклеотидов) с помощью электрофореза в агарозном геле. Затем образцы нуклеиновых кислот с геля переносят на нитроцеллюлёзную или нейлоновую мембрану (блотинг), на которой гибридизируют искомую ДНК с ДНК–зондом. Метод визуализации двухцепочечных комплексов зависит от типа метки ДНК–зонда. Положительная реакция гибридизации указывает на присутствие искомого фрагмента ДНК в данном образце.

**Нозерн-блот (Northern blot)**

##### Нозерн-блот, в отличие от саузерн-блота, позволяет оценить функциональную активность гена. Метод применяется для обнаружения искомой информационной РНК в исследуемом материале с помощью ДНК– или РНК–зонда. Экстрагированную РНК очищают от «загрязнения» геномной ДНК с помощью дезоксирибонуклеазы (ДНКазы). После электрофоретического разделения РНК в агарозном геле исследуемые образцы переносят на мембрану (как при саузерн-блоте) для гибридизации с олигонуклеотидным зондом и последующей визуализации специфической метки. Положительная или отрицательная реакции гибридизации указывают на включение или выключение экспрессии гена-мишени, соответственно.

**Полимеразная цепная реакция**

##### Полимеразная цепная реакция (ПЦР) теоретически позволяет обнаружить в пробе всего одну молекулу ДНК. Принцип метода основан на многократном увеличении числа копий искомого участка ДНК, достаточного для достоверной визуализации. Амплификацию (умножение) нуклеотидной последовательности ДНК катализирует ДНК–полимераза. Процесс репликации искомого фрагмента ДНК обуславливают ген-специфические праймеры  ДНК–олигонуклеотиды, каждый из которых комплементарен одной из двух цепей молекулы ДНК (рис. 1-11). Праймеры (20–30 нуклеотидных пар) служат затравками для ДНК–полимеразы при синтезе комплементарной цепи ДНК. Длина амплифицируемого участка синтезируемой ДНК ограничена праймерами и обычно составляет несколько сот пар нуклеотидов. При этом каждая вновь синтезированная цепь ДНК (амплификон) служит матрицей для синтеза новой цепи комплементарной ДНК. Для получения достаточного количества копий искомого фрагмента ДНК требуется от 20 до 30 циклов ПЦР, характеризующихся экспоненциальным увеличением числа копий специфического фрагмента ДНК. Каждый цикл реакции включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах.

######  1 этап (денатурация). Нагревание ДНК до 95 °C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

######  2 этап (отжиг). Гибридизация праймеров при 55–60 °C с комплементарными последовательностями на противоположных цепях ДНК (на левой и правой границах амплифицируемого фрагмента).

######  3 этап (элонгация). При температуре 68–72 °C праймеры в присутствии ДНК–полимеразы и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов служат затравками для синтеза новой цепи ДНК.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image020.jpg

**Рис. 1-11.** **Полимеразная цепная реакция.**Специфическая пара праймеров служит затравкой для амплификации искомого фрагмента ДНК. Один из праймеров (светлая стрелка) обеспечивает синтез ДНК от правой границы амплифицируемого фрагмента, а второй (чёрная стрелка) от левой. При этом каждая вновь синтезированная цепь ДНК является матрицей для дальнейшего синтеза ДНК. Поэтому с каждым циклом реакции происходит экспоненциальный рост количества копий искомого фрагмента ДНК. [123]

##### Процесс амплификации проводится в программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации. Материалом для выявления фрагмента ДНК, специфичного для наследственного или инфекционного заболевания могут служить биопсия, кровь, аспираты, носоглоточные смывы, соскобы из зева, мокрота, моча, эякулят, мазки, спинно-мозговая жидкость, амниотическая жидкость и даже законсервированные (например, парафинизированные) образцы органов и тканей. Для санитарно-эпидемиологического надзора важно то, что для ПЦР доступно исследование проб воды, почвы и образцов пищевых продуктов. В судебной медицине ПЦР позволяет провести идентификацию личности путём генотипирования любого биологического материала, поскольку ДНК сохраняет свою стабильность длительное время (например ДНК, экстрагированная из костной ткани). Генспецифические праймеры создают при помощи компьютерных программ, использующих информацию о нуклеотидной последовательности известных генов микроорганизмов или генов человека, предоставленных на сайтах GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) и EMBL (www.ebi.ac.uk/embl.html).

##### Полимеразная цепная реакция в классическом формате. Применяют для выявления локусов предполагаемых мутаций ДНК и ДНК–содержащих микроорганизмов. Из исследуемого материала экстрагируют геномную ДНК, искомый фрагмент которой амплифицируют с помощью ген-специфических праймеров. Конечный результат реакции свидетельствует о присутствии ДНК–мишени в исследуемом материале (например, ДНК вируса гепатита С, мутированный ген супероксиддисмутазы 1 при наследственной форме бокового амиотрофического склероза).

##### Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Для выявления специфических участков генома РНК–содержащих вирусов или исследования транскрипции гена-мишени (синтеза информационной РНК) сначала получают ДНК–копию с РНК–матрицы (информационной РНК), используя реакцию обратной транскрипции, катализируемую ферментом ревертазой (обратной транскриптазой). Синтезированные таким образом комплементарные ДНК (кДНК) служат матрицами для ген-специфических праймеров в ПЦР. Положительная ПЦР с праймерами, комплементарными специфической вирусной РНК, доказывает присутствие данного вируса в исследуемом материале. Обнаружение информационной РНК мутированного гена в образце ткани свидетельствует о транскрипции данного гена, т.е. его функциональной активности. Метод позволяет ответить на вопрос, работает или молчит определённый ген.

##### Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Показателем уровня экспрессии гена служит концентрация соответствующей информационной РНК. Метод ПЦР в реальном времени даёт возможность не только обнаружить в исследуемой ткани разрешённый к экспрессии ген, но и по динамике изменения концентрации информационной РНК количественно оценить активность этого гена. Из исследуемого материала экстрагируют РНК и с помощью обратной транскриптазы синтезируют комплементарные ДНК. Далее с кДНК–матрицы (реплика информационной РНК) в присутствии ген-специфических праймеров и ДНК–полимеразы выполняют ПЦР. В ходе реакции каждый амплифицируемый фрагмент включает флюоресцентную метку. По характеру включения метки специальные компьютерные программы позволяют определить абсолютное количество молекул мРНК в ткани и таким образом оценить степень функциональной активности гена.

**Гибридизация**

##### Гибридизация *in situ*. В ходе дифференцировки клеток координированно включаются и выключаются большие группы генов. Гибридизация одноцепочечной молекулы ДНК (ДНК–зонд) с комплементарной информационной РНК позволяет ответить на вопрос, присутствует или нет в ткани ген-мишень, происходит или нет экспрессия этого гена, и установить уровень, на котором она может меняться — транскрипция ДНК, сплайсинг РНК, трансляция (рис. 1-12). Метод гибридизации *in situ* позволяет выявить нужные последовательности ДНК или РНК (например, вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной в инфицированной ткани). Последовательности нуклеиновых кислот, связанные с меткой (радиоактивный 32P; биотин, характеризующийся высоким сродством к авидину), находят комплементарную последовательность в клетке. Таким образом, метод гибридизации *in situ* даёт возможность выявлять гены (рис. 1-12А), изучать их экспрессию и локализовать место трансляции.

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image021.jpg

**Рис. 1-12. Гибридизация *in situ*.**ДНК–зонд связывается с комплементарным участком информационной РНК в исследуемом образце. Визуализация связанного с меткой ДНК–зонда указывает на экспрессию гена-мишени в конкретном клеточном типе. [99]

##### https://nsau.edu.ru/downloads/library/ugebnik/gistologi/pages/book/HIST_01.doc.files/image022.jpg

**Рис. 1-12А. Гибридизация *in situ***. Стрелками указаны участки локализации Y‑хромосомы, ДНК–зонд: ген *sry*. Свежезамороженный срез.

##### Матричная гибридизация. Метод основан на технологии гибридизации ген-специфичных олигонуклеотидных ДНК–проб (20–25 нуклеотидов), иммобилизованных в матрицу биологических микрочипов (биочипов), с комплементарной ДНК (кДНК) исследуемого материала. Суммарную РНК экстрагируют из данного материала и с помощью обратной транскриптазы синтезируют кДНК в присутствии флюоресцентной или радиоактивной метки. Результаты гибридизации анализируют с помощью устройств, регистрирующих флюоресценцию или радиоактивность и сопутствующей компьютерной программы. Метод позволяет параллельно анализировать неограниченное число известных генов, поскольку количество иммобилизованных ДНК–проб в биочипе может варьировать от нескольких десятков до нескольких тысяч. В настоящее время доступны биочипы, содержащие десятки тысяч ДНК–проб, синтезированных на основе документированных генов человека. В онкологии практическое применение получили биочипы для диагностики и прогнозирования злокачественных опухолей молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, поджелудочной железы, лейкозов, лимфом.

**Технологии воздействия на экспрессию гена**

##### Конкретный ген отвечает за определённую функцию. Следовательно, в условиях экспериментального выключения экспрессии гена можно установить его функциональную значимость на уровне клетки, ткани, органа или организма в целом. Современные технологии позволяют остановить экспрессию гена на уровне мРНК без вмешательства в геномную ДНК.

##### Метод антисмыслового действия

######  Антисмысловая одноцепочечная ДНК, обычно длиной 15–25 пар нуклеотидов, комплементарно связывается с мРНК и ингибирует её трансляцию вследствие быстрого разрушения образующихся гибридных ДНК–РНК комплексов РНКазой H. Антисмысловые технологии применяют в генной терапии, где необходимо блокировать трансляцию мРНК–мишени, например при инфекционных (вирусных) и онкологических (лейкемия) заболеваниях.

######  Использование антисмысловых РНК (олигонуклеотидов) к различным компонентам цепи передачи митогенного сигнала для подавления их биосинтеза и блокады пролиферации трансформированных клеток считается перспективным подходом к лечению злокачественных опухолей. Уже сконструированы антисмысловые РНК для рецептора эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего фактора роста альфа (TGF) и некоторых других регуляторных молекул.

##### РНК интерференция  недавно открытый эволюционно консервативный механизм посттранскрипционной блокады синтеза белка. Комплементарное взаимодействие короткой интерферирующей РНК (siRNA) с информационной РНК заканчивается деградацией мРНК–мишени и как следствие прекращением синтеза чужеродного или эндогенного белка. Вызванная деградация мРНК без вмешательства в ядерный геном признана мощным экспериментальным инструментом, позволяющим эффективно и высоко избирательно ингибировать синтез белка–мишени в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*. Метод РНК интерференции может быть применён как в исследованиях роли отдельно взятого гена/белка при различных заболеваниях, так и при лечении генетически обусловленных болезней, характеризующихся избыточной экспрессией нормального или мутированного гена.

**МАСС-СПЕКТРОСКОПИЯ**

##### Это [физический](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B8%D0%B7%D0%B8%D0%BA%D0%B0) [метод](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D1%8B) исследования структуры вещества, основанный на измерении соотношения массы к заряду частиц вещества. В отличие от других физико-химических методов, определяющих излучение или поглощение энергии молекулами и атомами, масс-спектроскопия непосредственно детектирует сами частицы вещества. Большинство небольших органических молекул при ионизации приобретает только один заряд. Белки, нуклеиновые кислоты и другие полимеры способны приобретать множественные заряды. Чтобы получить масс-спектр необходимо перевести нейтральные молекулы и атомы в ионы, затем перевести ионы в газовую фазу в вакууме. Работа масс-спектрометров, приборов для разделения ионизированных частиц вещества по их массам, основана на воздействии магнитных и электрических полей на пучки ионов, летящих в вакууме. В медицине масс-спектроскопия применяется как метод газового анализа, для диагностики инфицированности человека, например *Helicobacter pylori*, для определения наличия [допинга](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%BE%D0%BF%D0%B8%D0%BD%D0%B3) в крови спортсменов.

**ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

##### Принцип метода состоит в разделении компонентов смеси, основанный на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна. Жидкостная хроматография как метод была открыта в 1903 году российским учёным Михаилом Цветом. Для разделения растительных пигментов на их составляющие учёный использовал колонки, заполненные порошком мела. Предложенный Цветом метод жидкостной хроматографии был незаслуженно забыт и почти не применялся более 30 лет. В настоящее время существует до 50 различных модификаций этого метода.

**Маркёры**

##### Каждый клеточный тип и его фенотипы характеризуются экспрессией конкретных генов, в большинстве случаев различных между разными клеточными типами. Идентификация специфических для них признаков — маркёров — позволяет определить наличие конкретного клеточного типа (*или*фенотипов клеточного типа). Это обстоятельство широко используют в медицине для диагностики разных заболеваний (маркёры иммунные, опухолевые, ферментные и т.д.). В экспериментальной и клинической практике нашли применение т.н. кластеры дифференцировки (CD–маркёры) и аллоантигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA-маркёры). Для диагностики хромосомных и моногенных заболеваний выявляют хромосомные маркёры и дефекты конкретных генов.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ**

**Клонированные гены**

##### В настоящее время выполняется многолетняя программа Геном Человека, цель которой — описание нуклеотидной последовательности и хранение клонированных генов человека (в идеале — всех аллелей). На старте находится ещё более грандиозная программа — Разнообразие Генов Человека. Значение этих программ для медицины переоценить невозможно. Уже сейчас получены впечатляющие результаты, позволяющие оценивать риск развития наследуемых болезней, проводить их диагностику и терапию [полученные методами генной инженерии и применяемые для заместительной терапии полипептиды человека (например, инсулин, гормон роста, интерфероны), трансфекция генов].

**Хромосомные маркёры**

##### Общая характеристика. Хромосомные маркёры известны давно (например, тельце Барра, Y-хромосома — детерминанта генетически мужского пола, филадельфийская хромосома). Частота хромосомных аномалий у детей, родившихся живыми, составляет 0,7%; у мертворожденных плодов — 5%; при ранних самопроизвольных абортах — 50%.

######  Тип поражения. Большинство хромосомных заболеваний возникает в результате мутаций *de novo*, по этой причине у других членов семьи их не обнаруживают. Хромосомные заболевания подразделяют на мозаицизм, аномалии числа и аномалии структуры хромосом.

 **Аномалии числа хромосом**. Примеры заболеваний, связанных с аномалией числа хромосом, — трисомии: хромосомы 21 (синдром Дауна), 18, 13, синдромы Кляйнфелтера и Тернера.

 **Аномалии структуры хромосом** — асимметричная транслокация, делеции, дупликации, инверсии и многие другие. Примеры заболеваний: синдромы Прадер–Вилли, кошачьего крика, опухоль Вильмса.

 **Мозаицизм** — хромосомная аномалия, характеризующаяся наличием двух и более клеточных линий с различным хромосомным набором. Мозаицизм — следствие нарушения митотического деления клеток на раннем этапе эмбрионального развития.

######  Методы хромосомного анализа. Исследуют находящиеся в метафазе митоза клетки из любой культуры тканей.

 **Периферическая кровь**.Стимулированные фитогемагглютинином клетки культивируют *in vitro* не менее трёх дней.

 **Костный мозг**. Исследование клеток костного мозга позволяет сократить время анализа до 6 ч. Наиболее часто исследование костного мозга проводят у больных лейкозами.

 **Внутренние органы**. Изучают также клетки внутренних органов и новообразований.

##### Аномалии числа аутосом. Хромосомная аномалия, при которой обнаруживают дополнительную хромосому какой-либо пары, — следствие нерасхождения хромосом в мейозе при ово- или сперматогенезе — трисомия. Лишь несколько типов трисомий совместимо с жизнью.

 **Синдром Дауна** встречают у одного ребёнка из 700 новорождённых. Как правило, при синдроме Дауна обнаруживают трисомию хромосомы 21, но возможны её транслокация и реже — мозаицизм.Критический возраст матери, после которого вероятность рождения больного ребёнка резко возрастает, составляет 35 лет.

 **Трисомия 21**. У 95% детей с синдромом Дауна обнаруживают 47 хромосом, причём три из них из 21 пары. В небольшом числе случаев дополнительную хромосому 21 ребёнок получает от отца. Возвратный риск — 1–2% (с возрастом матери увеличивается).

 **Транслокация**. У 4% детей с синдромом Дауна в кариотипе 46 хромосом и транслокация дополнительной хромосомы 21 [обычно в хромосомы группы D (13, 14, 15) или группы G (21, 22)]. Три четверти всех случаев транслокаций при синдроме Дауна обусловлено мутацией *de novo*. В 25% случаев транслокация носит семейный характер, т.е. у одного из родителей выявляется симметричная транслокация с вовлечением хромосомы 21. В таких случаях возвратный риск гораздо выше (до 15%).

 **Мозаицизм**. У 1–2% детей с синдромом Дауна находят мозаицизм, когда наряду с нормальной клеточной линией, содержащей 46 хромосом с двумя хромосомами из 21 пары, прослеживается и другая, где определяется 47 хромосом с трисомией хромосомы 21.

 **Трисомия 13**. Частота — до 1 на 4000 тыс. новорождённых. Прогноз неблагоприятный: 50% больных умирает на первом месяце жизни, 70% не доживает до 6 месяцев, 90% больных умирает, не достигнув одного года.

 **Трисомия**. 75% случаев — появление дополнительной хромосомы 13. Между частотой возникновения этой трисомии и возрастом матери также прослеживается зависимость.

 **Транслокация**. 20% случаев — следствие транслокации. Три из четырёх таких случаев — мутация *de novo*. В четверти случаев транслокация имеет наследственный характер (возвратный риск 15%).

 **Мозаицизм**. В 5% случаев наблюдается мозаицизм: наряду с нормальными клетками, имеющими 46 хромосом, присутствует клеточная линия с 47 хромосомами.

 **Трисомия 18** встречается у 1 из 8000 тыс. новорождённых детей. 90% случаев трисомии 18 — нарушение расхождения хромосом в мейозе, в 10% — мозаицизм, редко — транслокация. Прогноз крайне неблагоприятный: 90% больных не доживает до года.

##### Аномалии половых хромосом

 **Синдром Тернера**встречается у одной из 2 500 тыс. новорождённых девочек. Характерно наличие только одной нормальной Х-хромосомы (Х0-синдром). Прогноз зависит от вида и тяжести нарушений. В большинстве случаев заболевание не сказывается на продолжительности жизни.

 У 55% девочек с синдромом Тернера обнаруживают кариотип 45Х.

 В 25% случаев наблюдают изменение структуры одной из Х-хромосом. Как правило, такие структурные аномалии проявляются как делеция участка хромосомы либо как дупликация длинного или короткого плеча хромосомы с последующей утратой второго плеча.

 В 15% случаев выявляют мозаичность в виде двух или более клеточных линий, одна из которых имеет кариотип 45Х, а другая представлена кариотипом 46ХХ или 46ХY. Возможны и три клеточных линии с кариотипами 45Х, 46ХХ, 47ХХХ.

 **Синдром**Нунан имеет схожие фенотипические проявления, однако этиологически не связан с синдромом Тернера. В отличие от последнего, при синдроме Нунан заболеванию подвержены как мальчики, так и девочки, а в клинике доминирует задержка умственного развития.

 **Синдром Кляйнфелтера** развивается при появлении дополнительной Х-хромосомы и встречается у 1 из 1 000 тыс. новорождённых мальчиков. У 80% мальчиков с синдромом Кляйнфелтера найден кариотип 47ХХY. В 20% случаев находят мозаицизм (одна из клеточных линий имеет кариотип 47ХХY).

 **Кариотип 46ХХ** фенотипически похож на синдром Кляйнфелтера. Кариотип 46ХХ находят у 1 из 25 000 тыс. новорождённых. Причина — транслокациякороткого плеча Y-хромосомы в другую хромосому.

 **Кариотип 47ХХХ** — 1 на 1000 тыс. новорождённых девочек. Как правило, не обнаруживают никаких фенотипических особенностей, за исключением высокого роста. Среднее значение IQ составляет 90. У больных прослеживается тенденция к развитию шизофрении.

 **Кариотип 47ХYY**. Частота 1 на 1000 тыс. новорождённых мальчиков. Рост в среднем составляет 180 см.

##### Аномалии структуры хромосом

######  Делеции. Некоторые синдромы могут быть обусловлены утратой концевого участка хромосомы (концевая делеция) или потерей генетического материала в середине хромосомы (интерстициальная делеция). Причина большинства делеций — мутация *de novo*. Однако, при терминальных делециях может наследоваться асимметричная хромосомная транслокация (обмен между хромосомами неравными участками) от родителей, несущих симметричную реципрокную транслокацию (эквивалентный обмен генетическим материалом между двумя хромосомами).

 **Диагностика**. Для выявления малых делеций необходим хромосомный анализ высокой разрешающей способности (в прометафазе, когда наиболее чётко видна структура хромосом).

 **Синдром *кошачьего крика*** встречается у 1 из 50 000 тыс. новорождённых. Причина — терминальная делеция хромосомы 5p.

 **Синдром Прадер–Вилли**. У 70% больных наблюдается делеция хромосомы 15 (отцовский аллель). У 5% больных — перестройка хромосомы 15. В редких случаях у больного с внешне нормальным хромосомным набором выявляется материнская дисомия, когда в ходе мейоза происходит потеря отцовской хромосомы 15, но в зиготу попадает две хромосомы 15 от матери. Материнская дисомия, находящаяся в основе синдрома Прадер-Вилли, — пример импринтного гена.

 **Ретинобластома**. При одной из форм ретинобластомы имеется интерстициальная делеция хромосомы 13q.

 **Опухоль Вильмса**. В прометафазе клеток у детей с опухолью Вильмса и аниридией — интерстициальная делеция 11р13.

 **Парциальные трисомии** — наличие в кариотипе дополнительного хромосомного материала, включённого в конец длинного или короткого плеча хромосомы или в любой её участок. Часть дополнительной хромосомы может быть расположена и отдельно от других хромосом, имея собственную центромеру — малая, или маркёрная хромосома.

##### Хромосомные маркёры при диагностике опухолевого роста в гематологической онкологии

##### Хромосомные транспозиции, делеции и инверсии (вызванные, как правило, онкогенами) характерны для разных форм лейкозов и лимфом (табл. 1-3).

**Таблица 1-3. Некоторые хромосомные аномалии при лейкозах и лимфомах**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Хромосомная аномалия** |  | **Возможный онкоген** |
| **Лейкозы** |
| т(9;22) (q34;q11) | ХМЛ, ОМЛ | *bcr*,*c-abl* |
| т(8;21) (q22;q22) | ОМЛ (подтип М2) | *?c-mos*,*?c-myc* |
| т(15;17) (q22;q12) | ОМЛ (подтип М3) | *RAR *,*PML* |
| т или дел(11) (q23) | ОМЛ (подтипы М5, М4) | *int-2* |
| т(4;11) (q21;q23) | ОЛЛ | *int-2* |
| +12 | ХЛЛ |  |
| +8, -7, -7q, -5q | ОМЛ, ХМЛ (вторичные изменения) |  |
| **Лимфомы** |
| т(14;18) (q32;q21) | НМДЛ | *bcl-2* |
| т(8 или 2 или 22;14) (q32) | Лимфома Беркетта | *c-myc* |
| т(11;14) (q13;q32) | ХЛЛ, ДГКЛ | *bcl-1* |
| т(7;14 или 11 или 9) | T–клеточная лимфома | *tcl-1*,*tcl-2*,*tcl-3* |

Филадельфийская хромосома. **Условные обозначения**: т = транспозиция; инв = инверсия; дел = делеция; + = трисомия; - = моносомия; q = длинное плечо; p = короткое плечо; ОМЛ = острый миелобластный лейкоз; ОЛЛ = острый лимфобластный лейкоз; ХМЛ = хронический миелобластный лейкоз; ХЛЛ = хронический лимфобластный лейкоз; НМДЛ = нодулярная малодифференцированная лимфома; ДГКЛ = диффузная гигантоклеточная лимфома.

##### Лейкозы. При диагностике лейкозов используют также определение различных CD–Аг (см. ниже).

**Дефекты гена**

##### Описано около 5 000 тыс. наследуемых заболеваний (дефекты одного гена — моногенные болезни) с различным типом наследования: аутосомный доминантный — , аутосомный рецессивный — ,  — сцепленный с полом (точнее с Х- или с Y-хромосомой).

##### Аутосомно-доминантные синдромы обычно (хотя и не всегда) — результат мутации гена, кодирующего конкретный белок. Каждый ребёнок при одном больном родителе имеет 50% риск унаследовать заболевание. Обычно мутантный ген наследуется от одного из родителей, но иногда это может быть первым случаем проявления аутосомно-доминантного заболевания в данной семье — новая мутация, произошедшая в яйцеклетке или сперматозоиде.

######  Индивидуальная вариабельность проявления — характерный признак экспрессии мутантного гена. Например, поликистоз почек у одних больных проявляется ранней почечной недостаточностью, в то время как у других и в том же возрасте — только гипертензией при сохранении нормальной функции почек.

######  Плейотропность. Мутантный доминантный ген обычно оказывает влияние на несколько тканей или систем органов.

######  Методы диагностики

 **Анализ сцепления**. Многие рестрикционные фрагменты (РФ) располагаются близко от исследуемого гена в той же хромосоме и сегрегируют вместе с геном, что позволяет провести анализ сцепления. Для большинства заболеваний необходимо обследование нескольких членов семьи, включая хотя бы одного больного. В информативных семьях исследуют ДНК лейкоцитов или фибробластов кожи, а также амниоциты или клетки ворсин хориона. Под информативными понимают семьи, в которых РФ хромосом с мутантным геном отличаются от РФ хромосом с нормальным геном, или же такие семьи, в которых РФ у родителей с мутантным геном отличаются от РФ родителей без мутантного гена. Семья, в которой у обоих родителей РФ одинаковы, не является информативной. Анализ сцепления может быть использован при некоторых наследуемых заболеваниях (например, хорея Хантингтона, кистозный фиброз, мышечная дистрофия Дюшенна). В связи с расшифровкой многих мутаций генов кистозного фиброза и дистрофина, соответственно приводящих к развитию муковисцидоза и мышечной дистрофии, диагностику этих заболеваний в настоящее время проводят преимущественно прямым определением патологического гена.

 **Прямое исследование ДНК** значительно упрощает диагностику моногенных заболеваний даже в тех случаях, когда ген не идентифицирован; благодаря использованию рестрикционных эндонуклеаз и технологии рекомбинантной ДНК, стало возможным выявлять **полиморфизм длины рестрикционных фрагментов**, что позволяет обнаруживать аномальные гены. При некоторых заболеваниях (например, при серповидно-клеточной анемии) генетический анализ позволяет при помощи комплементарных ДНК–зондов напрямую выявить патологический ген. В этих случаях отпадает необходимость обследования других членов семьи.

######  Синдром Марфана встречается с частотой 1 на 20 000 новорождённых. Причина — мутация гена фибриллина, структурного белка соединительной ткани. Характерны нарушения обмена кислых мукополисахаридов (гликозаминогликанов) типа хондроитинсерной и гиалуроновой кислот в основном веществе соединительной ткани, что приводит к избыточному накоплению гликозаминогликанов в организме и выделению их с мочой. Нарушен также обмен оксипролина — существенного компонента коллагена.

##### Аутосомно-рецессивные заболевания проявляются только у гомозигот, когда мутация затрагивает оба аллеля. Многие заболевания этого типа появляются в результате мутации гена, кодирующего фермент. Если мутация затрагивает только один ген из пары, заболевание, как правило, не проявляется или проявляется в стёртой форме, т.к. активность фермента составляет половину от его нормы, чего в большинстве случаев достаточно.

######  Тип наследования. Человек с мутацией обоих аллелей гомозиготен по этому гену, а имеющий один мутантный и один нормальный аллель — гетерозиготен по этой паре генов и, как правило, не имеет клинических признаков синдрома.

######  Риск передачи. Если оба родителя ребёнка с аутосомно-рецессивным синдромом гетерозиготны по данному гену, каждый ребёнок у этой пары имеет риск проявления заболевания — 25%.

######  Кистозный фиброз (муковисцидоз) — наиболее распространённое аутосомно-рецессивное заболевание среди жителей Северной Европы. Частота болезни — 1 на 2000 новорождённых.

 **Этиология**. Дефект мембранного транспорта хлоридов приводит к нарушению секреции в дыхательных путях и пониженной экзокринной функции поджелудочной железы. Мутантный ген локализован в хромосоме 7q.

 **Диагностика**. Повышенная концентрация Cl– в поте больных, соответствующая клиника. ДНК–зонды позволяют идентифицировать 70% мутантных генов. В остальных случаях проводят анализ генетического сцепления.

######  Врождённые нарушения обмена веществ, как правило, — аутосомно-рецессивные заболевания, хотя некоторые их них наследуются как сцепленные с полом (например, недостаточность орнитинтранскарбоксилазы). Синдромы развиваются вследствие нарушений структуры или функции фермента или белков, транспортирующих метаболиты в клетку через клеточную мембрану. Метаболические врождённые нарушения могут сочетаться с избыточным накоплением вещества–предшественника, его токсических метаболитов или с дефицитом веществ, необходимых для нормального метаболизма. Отдельные метаболические нарушения встречаются редко, но они оказывают значительное влияние на физическое, интеллектуальное и психическое развитие. Определённые этнические группы имеют повышенный риск специфических метаболичeских нарушений (например, болезнь Тэя–Сакса часто встречается в популяции евреев Ашкенази и канадцев французского происхождения). Наиболее частые заболевания приведены в таблице 1-4.

**Таблица 1-4**.**Примеры моногенных болезней**

|  |  |
| --- | --- |
| **Нарушения** | **Заболевания** |
| Метаболизма аминокислот или органических кислот | Фенилкетонурия, гомоцистинурия, изовалериановая ацидемия |
| Метаболизма аммониевых соединений | Дефицит орнитинтранскарбамилазы |
| Метаболизма углеводов | Галактоземия, гликогенозы |
| Мукополисахаридозы | Синдром Хюрлер |

 **Нарушения обмена аминокислот и органических кислот**. При заболеваниях этой группы происходит блокада метаболизма, в результате накапливается субстрат фермента и/или его предшественники. Не менее важно отсутствие продуктов ферментной реакции. Диагностика: определение концентрации аминокислот, органических кислот и их метаболитов в моче или плазме крови.

 **Фенилкетонурия** — наиболее распространённое и изученное нарушение обмена аминокислот; частота — 1 на 12 000 новорождённых. Недостаточность фенилаланингидроксилазы нарушает превращение фенилаланина в тирозин, что приводит к накоплению токсических метаболитов — фенилацетата и фенилацетоуксусной кислоты. Профилактика задержки развития интеллекта осуществляется ранней диагностикой и назначением диеты с ограничением потребления продуктов, содержащих фенилаланин. Обязательны тесты, идентифицирующие детей с фенилкетонурией.

 **Гомоцистинурия**. Распространённость по наиболее частой форме — 1 на 100 000 живорождённых детей. Суммарная частота всех форм — значительно больше. Недостаточность цистатион синтетазы приводит к накоплению гомоцистина, экскретируемого с мочой. Возможен также дефицит 5-метилтетрагидрофолата.

 **Изовалериановая ацидемия** — недостаточность изовалерил-КоА дегидрогеназы, осуществляющей окислительное декарбоксилирование лейцина.

 **Нарушения обмена аммониевых соединений** встречаются с частотой 1 на 50 000 новорождённых, характерны нарушения в цикле мочевины и гипераммониемия.

 **Дефицит орнитинкарбамоилтрансферазы** — нарушение метаболизма в цикле мочевины.

 **Другие нарушения цикла мочевины** (например, цитруллинемия, аргининосукцинатная ацидурия, недостаточность карбамоилфосфатсинтетазы) по клиническому течению похожи на недостаточность орнитинкарбамоилтрансферазы.

 **Нарушения метаболизма углеводов**

 **Галактоземия** — тяжёлое врождённое нарушение обмена углеводов. Причина — недостаточность галактозо-1-фосфат–уридин–трансферазы, нарушено превращение галактозо-1-фосфата в глюкозо-1-фосфат.

 **Гликогенозы** (болезни накопления гликогена) — группа врождённых заболеваний, развивающихся при недостаточности ряда ферментов, в результате чего в тканях происходит накопление гликогена.

##### Сцепленные с Х-хромосомой дефекты. Эти заболевания возникают, когда мальчик наследует от матери мутантный ген Х-хромосомы. Наиболее распространённые заболевания этой группы: гемофилия типа А, цветовая слепота (дальтонизм), мышечная дистрофия Дюшенна.

######  Наследование. Риск заболевания зависит от того, кто из родителей (отец или мать) имеет аномальный ген.

 **Если мать** — **носитель дефектного гена**, существует 50% риска передачи этого гена каждому ребёнку. Мать гетерозиготна по данному гену, т.к. имеет две Х-хромосомы: одну с нормальным, другую с мутантным геном. У неё, скорее всего, неполная форма заболевания (согласно гипотезе Лайон, в каком-либо клеточном клоне транскрибируются гены дефектной Х-хромосомы). Таким образом, каждая девочка имеет 50% риска стать носителем, а мальчик — 50% риска быть поражённым. Больной мальчик гемизиготен по данному гену, т.к. он имеет единственную Х-хромосому с аномальным геном.

 **Аномальный ген отца может быть передан только дочерям**, т.е. все его дочери станут носителями. Так как Y-хромосома интактна, то все его сыновья будут здоровы.

######  Синдром ломкой Х-хромосомы — довольно частая причина умственной отсталости.

 **Распространённость**. Х-сцепленная форма умственной отсталости встречается у одного из 1000 мужчин и у 40% из них обнаруживается так называемая ломкая Х-хромосома. У некоторых женщин с умственной отсталостью также имеется ломкая Х-хромосома.

 **Диагноз**ставят на основании выявления хромосомного маркёра (т.н. хрупкий участок на дистальном конце длинного плеча Х-хромосомы). Для обнаружения маркёра лимфоциты больного культивируют в среде без фолиевой кислоты. Так как синдром встречается часто, то все дети с умственной отсталостью неясной этиологии должны пройти обследование с целью выявления ломкой Х-хромосомы.

######  Дефицит орнитинкарбамоилтрансферазы вызывает нарушение метаболизма аммониевых соединений. При этом заболевании страдают мальчики, а более трети девочек-носителей имеет отдельные симптомы заболевания (за счёт лайонизации).

**ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ КЛАСТЕРЫ**

##### Для разных типов клеток, как зрелых, так и на разных стадиях дифференцировки, характерно присутствие на наружной поверхности плазмалеммы молекул, образующих так называемые кластеры дифференцировки (Clasters of Differentiation, CD). Молекулы CD соотносят с антигенами, экспрессируемыми на наружной поверхности плазмалеммы дифференцирующихся клеток (дифференцировочные антигены). Молекулы CD являются специфическими поверхностно-клеточными маркёрами; их выявляют иммуногистохимическими методами с помощью моноклональных АТ. Некоторые CD–маркёры экспрессируются клетками на протяжении всей жизни, другие — только в течение одной стадии дифференцировки или во время клеточной активации. Впервые молекулы CD были охарактеризованы для лимфоцитов и различных клеток гемопоэтического ряда. Разным молекулам CD присвоен порядковый номер в соответствии с общепринятой международной системой (CD–маркёры, см. Приложения).

**HLA-МАРКЁРЫ**

##### Экспрессия аллоантигенов главного комплекса гистосовместимости служит диагностическим тестом при ряде заболеваний (табл. 1-5).

**Таблица 1-5. Сочетаемость антигенов HLA с заболеваниями**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Заболевания | Ассоциированные Аг | Относительный риск |
| **Ревматоидные** |
| Анкилозирующий спондилит | B27 | 87,0 |
| Синдром Рейтера | B27 | 37,0 |
| Реактивный артрит (*Yersinia, Salmonella, Neisseria gonorrhoeae*) | B27 | 18,0 |
| Псориатический артрит | B27, Bw38 | 10,7; 9,1 |
| Ювенильный ревматоидный артрит | B27, DRw8 | 4,5; 3,6 |
| Синдром Шёгрена | Dw3 | 9,7 |
| Системная красная волчанка | DR3 | 5,8 |
| **Желудочно-кишечные** |
| Глютенчувствительная энтеропатия | DR3 | 21,0 |
| Хронический активный гепатит | DR3 | 6,8 |
| Язвенный колит | B5 | 3,8 |
| **Гематологические** |
| Пернициозная анемия | DR5 | 5,4 |
| **Кожные** |
| Герпетиформный дерматит | Dw3 | 15,4 |
| Псориаз вульгарный | Cw6 | 4,8 |
| Пузырчатка вульгарная | DR4, A10 | 14,4; 5,9 |
| Синдром Бехчета | B5 | 6,3 |
| **Эндокринные** |
| Сахарный диабет I типа | DR4DR3DR2BfF1B8 | 6,43,30,215,02,7 |
| Гипертиреоидизм | Dw3 | 3,7 |
| Недостаточность надпочечников | Dw3 | 10,5 |
| **Неврологические** |
| Миастения | B8, DR3 | 2,7; 2,5 |
| Рассеянный склероз | DR2 | 3,9 |
| Маниакально-депрессивные состояния | Bw16 | 2,3 |
| Шизофрения | A28 | 2,3 |
| **Почечные** |
| Мембранозный гломерулонефрит | DR3 | 12,0 |
| Синдром Гудпасчера | DR2 | 15,9 |
| Поликистозная болезнь почек | B5 | 2,6 |
| IgA-нефропатия | DR4 | 4,0 |

**МАРКЁРЫ ОПУХОЛЕВЫЕ**

##### Опухолевые маркёры — вещества, выделяемые клетками опухоли. Выявление того или иного маркёра позволяет судить о присутствии в организме специфического типа опухоли. Для диагностики опухолей на практике применяют стандартные наборы тестирования опухолевых маркёров (таблицы 1-6 и 1-7).

###### CA-125 — надёжный маркёр рака яичника.

###### CA 15-3 — опухолевый маркёр; его уровень в крови больных метастатическим раком молочной железы коррелирует с активностью заболевания.

###### Определение уровня специфического Аг простаты помогает обнаружить раковую опухоль предстательной железы.

###### Клеточные онкогены (*c-myc*, *c-ras*, *c-erb* и др.), анти-онкогены (*Rb*, *p16*, *p53* и др.), маркёры пролиферации (Ki-67, PCNA и др.), присутствующие в опухолевой ткани, позволяют прогнозировать течение болезни и/или ответ новообразования на проводимое лечение.

**Мутация анти-онкогена** *BRCA1* (локус 17q21) обнаружена у женщин при ракемолочной железы в 10% случаев заболевания.

**Экспрессия онкопротеина c-erb В2** (напоминает рецептор эпидермального фактора роста) на поверхности опухолевых клеток указывает на неблагоприятный прогноз лечения заболевания.

**Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза** — ДНК–полимераза, обнаруживаемая в ядрах предшественников Т- и B–клеток; появляется в ядре после коммитирования стволовой кроветворной клетки в направлении лимфоидных клеток; по мере созревания клеток фермент перемещается в цитоплазму и исчезает. Участвует в генерации разнообразия АТ, осуществляя нематричный синтез ДНК между рекомбинирующими генами Ig. Маркёр при диагностике лейкозов.

**Таблица 1-6. Маркёры, применяемые для выявления тканевой природы опухолей**

|  |  |
| --- | --- |
| **Маркёр** | **Локализация, тип клетки или опухоли** |
| **Иммуногистохимический** |
| Кератины | Эпителиальный тип |
| Муцин | Аденокарцинома |
| Эстрогеновые и/или прогестероновые рецепторы | Молочная железа, эндометрий, яичник |
| Кислая фосфатаза | Предстательная железа |
| Тиреоглобулин | Щитовидная железа |
| Хромогранин | Нейроэндокринный тип |
| Белок S-100 | Саркома, меланома |
| Виментин, десмин | Саркома |
| Общий лейкоцитарный Аг | Лимфома |
| **Сывороточный** |
| ХГТ | Герминогенные опухоли, хорион, яички |
| АФП | Гепатомы, герминомы |
| Аг, специфичный для простаты | Предстательная железа |
| КЭАг | Карциномы ЖКТ |
| СА-125 | Яичник |
| СА 15-3 | Молочная железа |

**Условные обозначения**: КЭАг — карциноэмбриональный Аг, ХГТ — хорионический гонадотропин, АФП — -фетопротеин

**Таблица 1-7. Иммуномаркёры опухолей**

|  |  |
| --- | --- |
| **Орган** | **Аг: основные / дополняющие** |
| Лёгкие | SCC, NSE / CEA, TPA |
| Ухо, горло, нос | SCC |
| Молочная железа | CA15-3, CEA / TPA |
| Поджелудочная железа | CA19-9 / CEA |
| Печень | AFP / CA19-9 |
| Жёлчные пути | СА19-9 |
| Желудок | CEA, CA19-9 |
| Толстый кишечник | CEA / CA19-9 |
| Матка | SCC / TPA |
| Яичник | CA125 / CA19-9 |
| Хорион | HCG |
| Яички | AFP, HCG |
| Предстательная железа | PAP, PSA |
| Мочевой пузырь | TPA |

**Условные обозначения**: АФП — ‑фетопротеин, AFP; CEA carcino-embryonic antigen — КЭАг, карциноэмбриональный Аг; HCG human chorionic gonadotropin — ХГТ; NSE neuron-specific enolase — нейроноспецифическая енолаза; PAP prostatase acid phosphatase — кислая фосфатаза предстательной железы; PSA prostate-specific antigen — специфический Аг предстательной железы; SCC squamous cell carcinoma antigen — Аг плоскоклеточной карциномы; TPA tumor-derived polypeptide antigen — полипептидный Аг опухолевого происхождения; CA15‑3 — Аг рака молочной железы; CA19‑9 — Аг карцином кишечной трубки.

**АУТОАНТИТЕЛА**

**Системная красная волчанка**

##### Наиболее типичными находками при системной красной волчанке (СКВ) считают аутоантитела.

######  Антинуклеарные антитела (AНAТ) определяют с помощью иммунофлюоресцентных методов у 90% больных с использованием линий эпителиальных клеток человека (например,клетки НЕр-2). При внесении в тестируемую сыворотку компонентов ядер эпителиальных клеток, выделенных замораживанием-оттаиванием, AНAТ больного взаимодействуют с ними, образуя флюоресцирующие иммунные комплексы.

 **АТ** **к нативной ДНК** — высокоспецифичный диагностический тест; положителен у 65% больных с активной формой СКВ и реже либо в меньших титрах — у больных с неактивной формой СКВ.

 **АТ** **к гистонам**.У больных СКВ или с лекарственным волчаночноподобным синдромом можно выявить АТ к белкам ДНК.

 **АТ** **к малым ядерным рибонуклеопротеинам**(РНП) — частая находка у больных СКВ.

 **АТ** **к АгСмита**и **АТ к U1РНП**. Аг Смита содержит U1РНП-эпитоп и несколько других насыщенных уридином РНП (UРНП), поэтому у больных с АТ к Аг Смита часто определяют и АТ к U1РНП, но не наоборот. АТ к Аг Смита высокоспецифичны для СКВ; АТ к U1РНП встречают при СКВ и смешанной болезни соединительной ткани.

 **АТ** **к Ro**-**частицам** определяют чаще с помощью преципитации, хотя больные с АТ к Ro могут иметь АНАТ, выявляемые при использовании новых линий НЕр-2 клеток. АТ к Ro характерны для преимущественно кожной формы волчанки и фотосенсибилизации. В большинстве случаев, AНAТ-отрицательная волчанкатакже ассоциирована с циркуляцией АТ к Ro-частицам; кроме того, их считают маркёром синдрома Шёгрена.

 У больных СКВ и синдромом Шёгренамогут также выявлять АТ к La,другому малому ядерному РНП (почти всегда обнаруживают у больных с АТ к Ro).

######  Антитела к мембранным и цитоплазматическим компонентам. При СКВ нередко определяют АТ к транспортной РНК и рибосомальным нуклеопротеинам. Другие цитоплазматические АТ взаимодействуют, очевидно, с фосфолипидами клеточных мембран и опосредуют цитотоксические реакции в некоторых органах и тканях (АТ к обкладочным клеткам желудка, эпителиальным клеткам щитовидной железы и клеточным элементам крови).

**Синдром Гудпасчера**

##### Синдром Гудпасчера — аутоиммунное заболевание, проявляющееся лёгочным кровотечением в сочетании с тяжёлым прогрессирующим гломерулонефритом. В крови циркулируют АТ (выявляются в 95% случаев) к коллагену типа IV базальной мембраны почечного тельца. Аутоантитела связываются с базальной мембраной в лёгких и почках.

**ФЕРМЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА**

**Инфаркт миокарда**

##### Некроз миокарда сопровождается выходом из повреждённых кардиомиоцитов креатинфосфокиназы, аспартат-аминотрансферазы, лактатдегидрогеназы и повышением их активности в сыворотке крови.

######  Максимальное повышение активности креатинфосфокиназы в крови наблюдают через 6 часов после начала инфаркта, аспартат-аминотрансферазы — через 12 ч, а лактатдегидрогеназы — через 24 ч.

######  Активность этих ферментов может быть повышена и при ряде других заболеваний, но определение спектра изоферментов может с высокой степенью достоверности подтвердить наличие некроза в миокарде. Так, уровень МВ-изофермента креатинфосфокиназы в крови повышается только при инфаркте миокарда, а характерное для него преобладание изофермента 1 лактатдегидрогеназы (ЛДГ1) сохраняется иногда до двух недель.

**Вирусные гепатиты**

##### Определение активности аланин-аминотрансферазы и аспартат-аминотрансферазы в сыворотке крови производится при диагностике заболеваний печени. Синдром цитолиза: повышение в сыворотке содержания аланин-аминотрансферазы и аспартат-аминотрансферазы характерен для всех клинических вариантов острых вирусных гепатитов.

**Модели болезней человека на животных**

##### Для определения влияния конкретных генов на онтогенетические процессы, их участия в проявлении тех или иных функций широко используют мутантные линии животных, в первую очередь мышей, у которых выявлено несколько сотен мутантных генов. Более того, при помощи методов генной инженерии реализована возможность получения мутанта, дефектного по строго заданному признаку.

**ХИМЕРЫ**

##### Химера — мутант, полученный из двух биологических видов. Технология создания химер основана на трансплантации плюрипотентных, полипотентных или унипотентных стволовых клеток от одного вида животного в эмбрион другого. Эта тактика широко применяется в экспериментальной эмбриологии с целью выяснения путей дифференцировки и миграции трансплантированных стволовых клеток в организме реципиента. В результате трансплантации эмбриональных стволовых клеток с введённой чужеродной ДНК в бластоцисту мыши были получены генетически модифицированные трансгенные химеры, экспрессирующие ген (трансген) другого вида млекопитающего.

**ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МЫШИ**

##### Мышь относится к наиболее изученному млекопитающему. На сегодняшний день имеется полная расшифровка генома мыши (30 тыс. генов), который на 80% гомологичен геному человека. Поэтому мыши, полученные с помощью генной инженерии, являются удобной биологической моделью для изучения механизмов патогенеза заболеваний, связанных с мутацией известного гена, а также разработки методов лечения заболевания, вызванного мутацией данного гена (табл. 1-8).

**Уровни генетической модификации**

##### Адресная инсерция экзогенной ДНК в ген-мишень. Введение чужеродной ДНК (трансгеноз) основано на рекомбинации между экзогенной чужеродной ДНК и ДНК генома стволовой клетки (генный таргетинг). Подобная рекомбинация позволяет получать наследуемые мутации в любом интересующем гене.

##### Направленные перестройки в хромосомах (внутрихромосомные, межхромосомные), перенос индивидуальных хромосом или их фрагментов, создание мини-хромосом или искусственных хромосом.

##### Целый геном. Клонирование с помощью трансплантации ядер.

**Получение генетически модифицированных мышей**

##### На первом этапе создают генные конструкции — ретровирусные или плазмидные векторы. Например, к «разрезанной» одноцепочечной РНК ретровируса или к «разрезанной» кольцевой молекуле двухцепочечной ДНК плазмиды добавляют экзогенную ДНК, содержащую, например, мутированный ген человека. На втором этапе полученные векторы трансфецируют в эмбриональные стволовые клетки (трансгеноз). Полученные многочисленные колонии стволовых клеток с помощью ПЦР подвергают скринингу на наличие нужной последовательности ДНК. Инсерция экзогенной ДНК должна произойти в области гена-мишени, т.е. нормальная геномная аллель должна быть замещена мутантной (генный таргетинг). На третьем этапе трансфецированные стволовые клетки, содержащие мутантную аллель гена, инъецируют в бластоцисту. Далее бластоцисту пересаживают в матку приёмной матери. Последующие скрещивания позволяют получить гетеро- или гомозиготных мышей по данному гену. Если экзогенная ДНК присутствует в половых клетках и мыши передают приобретённый ген своему потомству, то выведенные животные с таким устойчивым изменением в геноме называются трансгенными.

######  Нокаутные и трансгенные мыши. Методология гомологичной рекомбинации эндогенной и экзогенной ДНК позволяет либо полностью инактивировать ген-мишень в целом организме (*knockout*, нокаут генов, нокаутные мыши), либо вводить гены с направленными мутациями (*knock-in*, генный нокин, трансгенные мыши).

######  Экспрессирующие векторы. Плазмидные и вирусные векторы конструируют таким образом, что экзогенная ДНК присоединяется к сильному промотору транскрипции. Трансфекция такого вектора в бактерии и дрожжи позволяет получать большие количества рекомбинантных белков (гормон роста, интерферон, иммуноглобулины). Из молока трансгенных козы или коровы, трансфецированных экспрессирующим вектором, можно выделять различные рекомбинантные белки, например лактоферрин. Среди млекопитающих лактоферрин содержится только в молоке женщины и коровье молоко с лактоферрином может успешно заменить женское молоко при искусственном вскармливании.

######  Трансгенный человек. Генетическая трансформация плодовых мушек (*Drosophila*) и животных проводится во многих лабораториях мира. На сегодняшний день рождение генетически модифицированного человека совершенно реально. Но подобные эксперименты недопустимы с моральной точки зрения по причине распространения «искусственных» мутаций в человеческой популяции.

##### Модели нейродегенеративных болезней человека на мышах

######  Болезнь Альцхаймера

 **-Амилоидный белок**откладывается в головном мозге в виде сенильных бляшек, провоцируя гибель нейронов. Мыши *APPSWE* (2576) экспрессируют трансген, кодирующий предшественник -амилоидного белка человека. У трансгенных мышей отложение мутантного белка сопровождается дегенерацией нервных клеток и нарушениями памяти, как у человека.

 **Мутации пресенилина**способствуют образованию амилоидогенных форм -амилоидного белка.Трансгенные мыши*Psen1tm1Tak*экспрессируют мутантный белок пресенилин 1 (PS1). У нокаутных мышей*Psen2tm1Ber*экспрессия пресенилина 2 (PS2) блокирована.

######  Болезнь Шарко–Мари–Тута — одна из форм невропатий — развивается при мутации гена коннексина, кодирующего белок щелевого контакта, что и было выяснено при изучении сходных мутаций у мышей.

######  Боковой амиотрофический склероз

 **У мышей-гомозигот по гену *pmn*** (progressive motor neuropathy) развивается тяжёлая моторная невропатия. Введение таким мышам цилиарного нейротрофического фактора предупреждало патологическую гибель двигательных нейронов. Этот подход предложен для лечения бокового амиотрофического склероза.

 **Мутантные мыши-гомозиготы *wobbler* по гену *wr***характеризуются рецессивным наследованием нейродегенеративного заболевания с прогрессирующей гибелью мотонейронов в шейном отделе спинного мозга.

##### Часть случаев семейной формы заболевания обусловлена доминантными мутациями гена *SOD1*, кодирующего фермент Cu/Zn супероксиддисмутазу 1. Трансгенные мыши G93A, экспрессирующие мутантный SOD1 (Gly93Ala; глицин замещён на аланин в позиции 93), характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов, как при боковом амиотрофическом склерозе человека.

######  Болезнь Хантингтона — наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся  прогрессирующей гибелью нервных клеток в базальных ганглиях, особенно в хвостатом ядре и скорлупе. Патогенез заболевания связан с мутацией гена хантингтина *HD*. Модель заболевания — трансгенные мыши R6/2; мутированный *HD* содержит >150 повторов CAG кодонов и кодирует аберрантный белок с увеличенным полиглутаминовым треком.

######  Спиномозжечковая атаксия. У SCA1 [*82Q*] мышей избыточная экспрессия мутированного гена *ATX1* (атаксин 1), вызывает дегенерацию грушевидных клеток Пуркинье и нейронов ствола мозга. Нормальный белок содержит от 6 до 44 остатков глутамина, аберрантный белок имеет полиглутаминовый трек из 82 остатков глутамина.

**Таблица 1-8. Базы данных генетически модифицированных мышей**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Название базы данных** | **URL сайта** | **Краткое описание** |
| [Trans-NIH Mouse Initiative](http://www.nih.gov/science/models/mouse/)  | <http://www.nih.gov/science/models/mouse/> | Нокаутные мыши, доступные в Национальном Институте Здоровья США |
| [MMRRC: Mutant Mouse Regional Resource centers](http://www.mmrrc.org/index.html) | http://www.mmrrc.org/index.html | Мутантные мыши и эмбриональные стволовые клетки |
| [ORNL Mutant Mouse Database](http://bio.lsd.ornl.gov/mouse/)  | http://bio.lsd.ornl.gov/mouse/ | Мутантные мыши, выведенные после воздействия химии и радиации |
| [EMMA - the European Mouse Mutant Archive](http://www.emma.rm.cnr.it/) | http://www.emma.rm.cnr.it/ | Мутантные мыши, архив криоконсервированных стволовых клеток Европы |
| [MMHCC Cancer Models Database](http://cancermodels.nci.nih.gov/mmhcc/index.jsp)  | http://cancermodels.nci.nih.gov/mmhcc/index.jsp | База данных опухолевых моделей |
| [Mouse Knockout & Mutation Database (MKMD)](http://research.bmn.com/mkmd)  | <http://research.bmn.com/mkmd> | Информация по нокаутным/трансгенным мышам |
| [CMHD ENU Mutagenesis](http://www.cmhd.ca/) | http://www.cmhd.ca/ | Центр моделирования болезней человека |
| [Transgenic Models of Skin Disease Core at Harvard](http://dermatology.bwh.harvard.edu/transgenic.html) | <http://dermatology.bwh.harvard.edu/transgenic.html> | Модели болезней кожи |
| [FBS, A JOURNAL AND VIRTUAL LIBRARY](http://www.bioscience.org/manuscr.htm) | <http://www.bioscience.org/knockout/alphabet.htm> | Перечень нокаутных мышей в алфавитном порядке по имени «выключенного» гена |
| [Whole Mouse Catalog: Genome](http://www.rodentia.com/wmc/domain_genome.html) | <http://www.rodentia.com/wmc/domain_genome.html> | Генетические карты, список генов, цитогенетика, генетически модифицированные мыши |