

БИОЛОГИЯ
Решение 1 (заочного) этапа
11 класс

1 задание (15 баллов)

Во многих случаях для успешной ДНК-диагностики достаточно исследовать небольшие фрагменты геномной ДНК. Однако для проведения анализа необходимо получать достаточное количество таких фрагментов. С этой целью осуществляют амплификацию (умножение) фрагментов ДНК.

Вопросы:

- 1) Как называется данный метод?
- 2) Какие компоненты необходимы для проведения исследования?
- 3) Как осуществляется регистрация результатов при проведении данного исследования? Опишите наиболее часто применяемый метод регистрации результатов в практике клинико-диагностических лабораторий.
- 4) Какой вариант метода применяют для выявления РНК (РНК-содержащих вирусов, определения микроРНК как маркеров заболеваний)? На чем основан данный метод?

Ответы:

- 1) Полимеразная цепная реакция (ПЦР) (1 балл)
- 2) Для протекания полимеразной реакции *in vitro* необходимы следующие компоненты:
 - 1) исходная ДНК (ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать);
 - 2) термостабильная ДНК-полимераза;
 - 3) дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ);
 - 4) ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
 - 5) буферный раствор, который обеспечивает поддержание оптимального рН;
 - 6) короткие одноцепочные ДНК-затравки (праймеры).Праймеры – искусственно синтезируемые одноцепочные фрагменты ДНК размером 15-30 нуклеотидов, которые комплементарны соответствующим участкам ДНК-мишени. Праймеры играют ключевую роль в амплификации, служат затравкой для ДНК-полимеразы. Для проведения ПЦР используется два праймера (прямой и обратный), гибридизующихся в соответствии с принципом комплементарности с противоположными цепями ДНК и ограничивающих участок матричной молекулы, который и будет амплифицирован в ходе реакции. Прямой праймер «садится» на транскрибируемую (матричную) цепь в начале фрагмента и обеспечивает синтез дочерней цепи от начала к концу. Обратный праймер соединяется с нетранскрибируемой цепью ДНК в конце фрагмента и обеспечивает синтез другой дочерней цепи в направлении от конца к началу (5 балла).

3) По способу детекции выделяют следующие варианты ПЦР:

1) ПЦР с детекцией методом электрофореза в агаровом или полиакриламидном геле с применением интеркалирующих красителей (например, бромистый этидий). *Это классический вариант ПЦР-анализа* (был разработан первым) 2) ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации прямо в ходе реакции, в «реальном времени» (*ПЦР в реальном времени*) (1 балл).

ПЦР в реальном времени - это основной и наиболее часто применяемый метод в практике клиничко-диагностических лабораторий для выявления специфических фрагментов ДНК, в том числе разных мутаций. В основе детекции лежит принцип гибридизации флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда (ДНК-зонда) и амплифицированной ДНК. Присутствие зондов, комплементарных специфическим ампликонам в реакционной смеси, позволяет количественно регистрировать накопление продуктов амплификации в процессе ПЦР в режиме реального времени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала, что отражается на кривых накопления флуоресценции в ПЦР в реальном времени. При постановке ПЦР в режиме реального времени амплификатор является одновременно и детектором. Таким образом, одновременно происходит и амплификация, и регистрация ее продуктов, что позволяет в реальном времени анализировать накопление ампликонов и выявлять изменения в их нуклеотидной последовательности (5 баллов).

4) ПЦР применяется и для исследования РНК, при этом используется метод ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-ПЦР) в реальном времени (1 балл). Это связано с тем, что ПЦР способна проходить только на матрице ДНК. Для исследования РНК перед ПЦР проводят реакцию обратной транскрипции (ОТ), которая представляет собой метод синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК. В ходе ОТ-ПЦР одноцепочная РНК превращается в одноцепочную кДНК, которую затем амплифицируют в ПЦР. Амплификация сопровождается детекцией амплификационных фрагментов (2 балла).

2 задание (15 баллов)

В медицинском вузе изучали реакции клеточного иммунитета организма при иммунологическом конфликте. Работы были выполнены на новорожденных мышах - гибридах (СВА х С57BL/6) F1. Клетки селезенки мышей родительской линии С57BL/6 вводили в брюшную полость четырехдневным гибридам F1. Через 30 дней после введения большинство мышат – гибридов F1 погибало.

Вопросы.

- 1) Как называется и проявляется реакция мышей – гибридов F1 на введение клеток селезенки мышей родительской линии С57BL/6.
- 2) Какие популяции клеток селезенки принимают участие в данной реакции?

3) В каких случаях данная реакция может возникать в клинической практике?

Ответы:

1) Острая форма системной реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – болезнь рант. Внутривентриальное введение четырехдневным гибридам (СВА x С57BL/6) F1 клеток селезенки родительской линии С57BL/6 сопровождалось развитием клинических признаков болезни рант: взъерошенность шерсти, адинамия, атаксия, вздутие живота, диарея, падение массы тела? (5 баллов).

2) В основе развития системной РТПХ, индуцированной у новорожденных мышей – гибридов F1, лежит иммуносупрессия. Супрессорные клетки подавляют активность Т – хелперов, генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток. Супрессорные клетки неоднородны по своему составу и представлены Т-супрессорами и супрессорами-макрофагами? (5 баллов).

3) В клинической практике реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) может развиваться при пересадке лимфоидной и гемопоэтической ткани у взрослых пациентов и детей, страдающих тяжелыми заболеваниями крови, врожденными и приобретенными иммунодефицитами, несмотря на тщательный подбор донора и реципиента по антигенам гистосовместимости? (5 баллов).

3 задание (10 баллов)

В инфекционное отделение городской больницы доставлен пациент в тяжёлом состоянии (температура выше 38⁰С, спутанное сознание, отёки на лице). В ходе общения с пациентом удалось установить, что мужчина часто выезжал на охоту, иногда употреблял в пищу мясо кабана.

Вопросы:

- 1) Каков Ваш предполагаемый диагноз?
- 2) Относится ли данное заболевание к природно-очаговым?
- 3) Что такое природный очаг? В чём особенности природно-очаговых заболеваний? Какие компоненты природного очага Вы знаете? Кто был автором учения о природной очаговости? Приведите примеры природно-очаговых инфекций
- 4) Какие меры личной и общественной профилактики трихинеллёза Вам известны?

Ответы:

- 1) Трихинеллёз (1 балл)
- 2) Трихинеллёз относится к природно-очаговым заболеваниям (1 балл)
- 3) Е.Н. Павловский сформулировал учение о природной очаговости болезней (1 балл). Природный очаг - это определенный географический

ландшафт, в котором происходит циркуляция возбудителя от донора к реципиенту через переносчика (1 балл). Особенности природно-очаговых заболеваний:

- Возбудители циркулируют в природе независимо от человека.
- Резервуаром служат дикие животные, входящие вместе с возбудителями и переносчиками в один биоценоз (паразитарная система).
- Распространены на ограниченной территории с определенным географическим ландшафтом (1 балл)

Компоненты природного очага:

- 1) возбудитель болезни;
- 2) переносчик возбудителя;
- 3) донор возбудителя - это больные животные;
- 4) реципиент возбудителя - здоровые животные;
- 5) определенный биотоп (2 балла).

К природно-очаговым заболеваниям относят трансмиссивные заболевания (лейшманиоз, трипаносомоз, клещевой энцефалит, возвратный тиф, туляремия, чума и т.д.), а также не трансмиссивные (дифиллоботриоз, описторхоз, трихинеллёз и др.) (1 балл).

4) **Общественная профилактика:** организация санитарно-ветеринарного контроля, осмотр туш на трихинеллёз, уничтожение мяса, в котором обнаружены трихинеллы, зоогигиеническое содержание свиней, борьба с крысами.

Личная: избегать употребление мяса, не прошедшего ветеринарный контроль (2 балла)

4 задание (10 баллов)

Известно, что в соматических клетках женского организма в норме присутствуют две половые X-хромосомы. Но одна из них на 16-е сутки эмбрионального развития спирализуется и переходит в неактивное состояние, образуя половой хроматин, или тельце Барра.

Наследственное заболевание гемофилия – несвёртываемость крови при кровотечениях – кодируется рецессивным геном, локализованным в X-хромосоме. Заболевание чаще встречается у мужчин, так как в клетках их тела присутствует лишь одна X-хромосома (вторая – Y-хромосома). И почти все рецессивные гены X-хромосомы поэтому проявляются.

Вопросы:

1. Почему у женщин, гетерозиготных по гену гемофилии, также частично может проявляться это заболевание?
2. Каковы механизмы инактивации одной X-хромосомы в соматических клетках женского организма?
3. Каково значение этого явления (инактивации второй X-хромосомы)?

Ответ:

1. У женщин одна из X-хромосом инактивируется случайным образом. Поэтому в одних клетках тела может инактивироваться мутантная X-хромосома (с рецессивным геном гемофилии), а в других – здоровая. Поэтому явления гемофилии могут частично проявляться в части соматических клеток, где спирализована здоровая X-хромосома (2 балла).
2. Метилирование ДНК (присоединение метильных группировок к участкам молекулы ДНК) угнетает транскрипцию генов эукариот. Оказалось, что ДНК неработающей X-хромосомы сильно метилирована. Это важно для блокировки генной активности. Метилирование ДНК блокирует гены всерьёз и надолго (5 баллов).
3. В центре инактивации X-хромосомы (Xic – X inactivation center) есть ген Xist, кодирующий РНК, которая и «покрывает» неактивную X-хромосому (2 балла).
4. Угнетение работы генов инактивированной хромосомы снижает дозу генов по сравнению с гетерогаметным полом (мужским), имеющим лишь одну X-хромосому (1 балл).