

*Цитогенетические
методы*

- **Цитогенетика** – раздел генетики, изучающий закономерности наследственности и изменчивости на уровне клетки и субклеточных структур, главным образом хромосом.
- **Цитогенетические методы** предназначены для изучения структуры хромосомного набора или отдельных хромосом.
- **Основа цитогенетических методов** — микроскопическое изучение хромосом человека.
- **Микроскопические методы исследования хромосом человека** начали использоваться в конце XIX века.
- Термин **«цитогенетика»** введен в 1903 г. Уильямом Саттоном.

- Цитогенетические исследования стали широко использоваться с начала 20-х гг. XX в. для изучения морфологии хромосом человека, подсчета хромосом, культивирования лейкоцитов для получения метафазных пластинок.
- В 1959 г. французские ученые Д. Лежен, Р.Тюрпен и М. Готье установили хромосомную природу болезни Дауна. В последующие годы были описаны многие другие хромосомные синдромы, часто встречающиеся у человека.
- В 1960 году Р. Мурхед с соавт. разработали метод культивирования лимфоцитов периферической крови для получения метафазных хромосом человека, что позволило обнаруживать мутации хромосом, характерные для определенных наследственных болезней.

Применение цитогенетических методов:

- изучение нормального кариотипа человека,
- диагностика наследственных заболеваний, связанных с геномными и хромосомными мутациями,
- исследование мутагенного действия различных химических веществ, пестицидов, инсектицидов, лекарственных препаратов и др.

Объектом цитогенетических исследований могут быть делящиеся соматические, мейотические и интерфазные клетки.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- **Световая микроскопия**
- **Электронная микроскопия**
- **Конфокальная микроскопия**
- **Люминесцентная микроскопия**
- **Флуоресцентная микроскопия**

Показания для проведения цитогенетических исследований

- Подозрение на хромосомную болезнь по клинической симптоматике (для подтверждения диагноза)
- Наличие у ребенка множественных ВПР, не относящихся к генному синдрому
- Многократные спонтанные аборт, мертворождения или рождения детей с ВПР
- Нарушение репродуктивной функции неясного генеза у женщин и мужчин
- Существенная задержка умственного и физического развития у ребенка

- **Пренатальная диагностика (по возрасту, в связи с наличием транслокации у родителей, при рождении предыдущего ребенка с хромосомной болезнью)**
- **Подозрение на синдромы, характеризующиеся хромосомной нестабильностью**
- **Лейкозы (для дифференциальной диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза лечения)**
- **Оценка мутагенных воздействий различных химических веществ, пестицидов, инсектицидов, лекарственных препаратов и др.**

- В период деления клеток на стадии метафазы хромосомы имеют более четкую структуру и доступны для изучения. Обычно исследуют лейкоциты периферической крови человека, которые помещают в специальную питательную среду, где они делятся. Затем готовят препараты и анализируют число и строение хромосом.

Цитогенетические исследования соматических клеток

- Получение препаратов митотических хромосом
- Окраска препаратов (простые, дифференциальные и флуоресцентные)
- Молекулярно-цитогенетические методы – метод цветной гибридизации *in situ* (FISH)

- **К цитогенетическим методам, применяемым в клинической практике, относятся:**
 - классические методы кариотипирования;
 - молекулярно-цитогенетические методы.
- **До недавнего времени диагностика хромосомных болезней базировалась на использовании традиционных методов цитогенетического анализа.**

- Для изучения хромосом чаще всего используют препараты кратковременной культуры крови, а также клетки костного мозга и культуры фибробластов.
- Кровь с антикоагулянтом центрифугируют для осаждения эритроцитов, а лейкоциты инкубируют в культуральной среде 2-3 дня. К образцу крови добавляют **фитогемагглютинин**, так как он ускоряет агглютинацию эритроцитов и стимулирует деление лимфоцитов.
- Наиболее подходящая фаза для исследования хромосом — метафаза митоза, поэтому для остановки деления лимфоцитов на этой стадии используют **колхицин**. Добавление этого препарата к культуре приводит к увеличению доли клеток, находящихся в метафазе, то есть в той стадии клеточного цикла, когда хромосомы видны лучше всего. Каждая хромосома реплицируется и после соответствующей окраски видна в виде двух хроматид, прикрепленных к центромере, или центральной перетяжке. Затем клетки обрабатывают гипотоническим раствором хлорида натрия, фиксируют и окрашивают.
- Для окраски хромосом чаще используют краситель Романовского-Гимзы, 2% ацеткармин или 2% ацетарсеин. Они окрашивают хромосомы целиком, равномерно (рутинный метод) и могут быть использованы для выявления численных аномалий хромосом человека.

Денверская классификация хромосом человека (1960).

Группа А (1-3) – три пары самых крупных хромосом: две метацентрические и 1 субметацентрическая.

Группа В – (4-5) – две пары длинных субметацентрических хромосом.

Группа С (6-12) – 7 пар субметацентрических аутосом среднего размера и X-хромосома.

Группа D (13-15) – три пары средних акроцентрических хромосом.

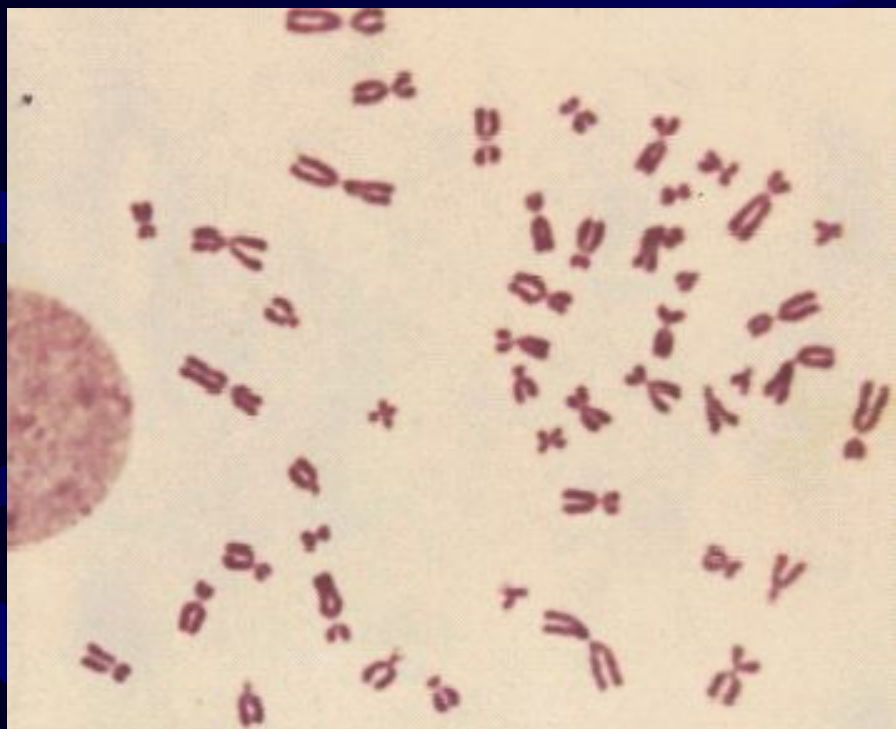
Группа E (16-18) – три пары метацентрическая и субметацентрические хромосомы.

Группа F (19-20) – две пары маленьких метацентрических хромосом.

Группа G (21-22 и Y) – две пары мелких акроцентрических хромосом и Y-хромосома.

1. Рутинная (равномерная) окраска

Используется для анализа числа хромосом и выявления структурных нарушений (аббераций).



При рутинной окраске достоверно можно идентифицировать только группу хромосом, при дифференциальной – все хромосомы

Идиограмма хромосом человека в соответствии с Денверской и Парижской классификациями

A

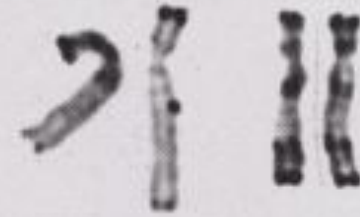


1

2

3

B



4

5

C



6

7

8

9

10

11

12

D



13

14

15

16

17

18

E

F



19

20

G



21

22

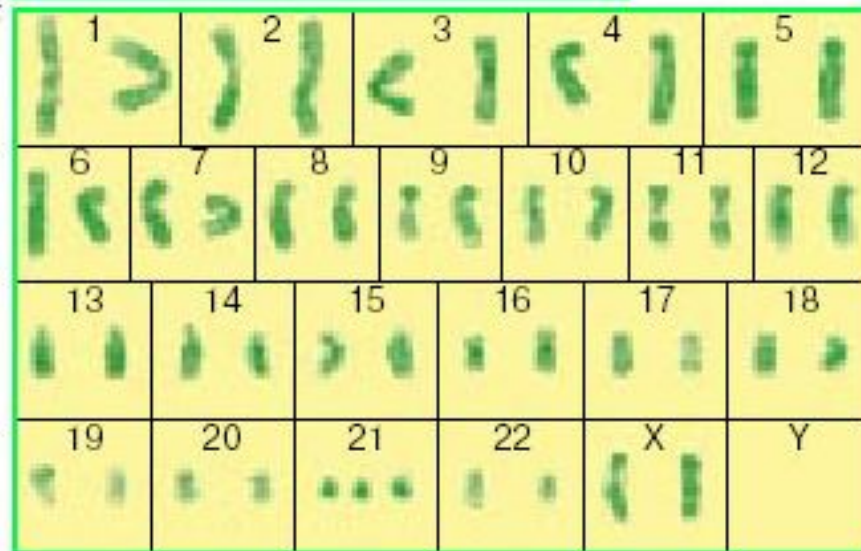
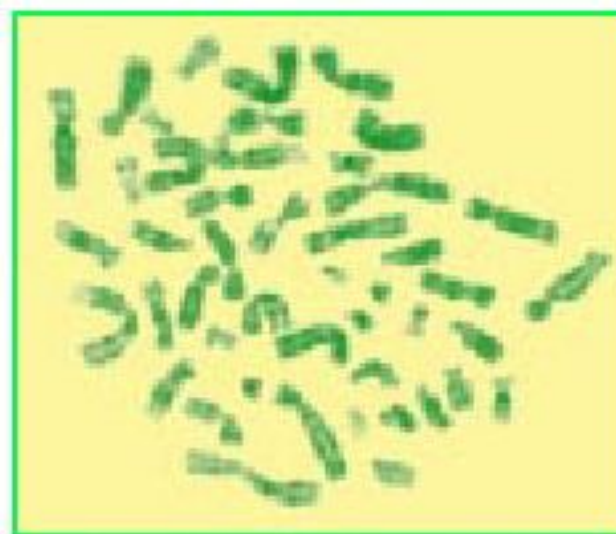


XY

Методы дифференциальной окраски хромосом

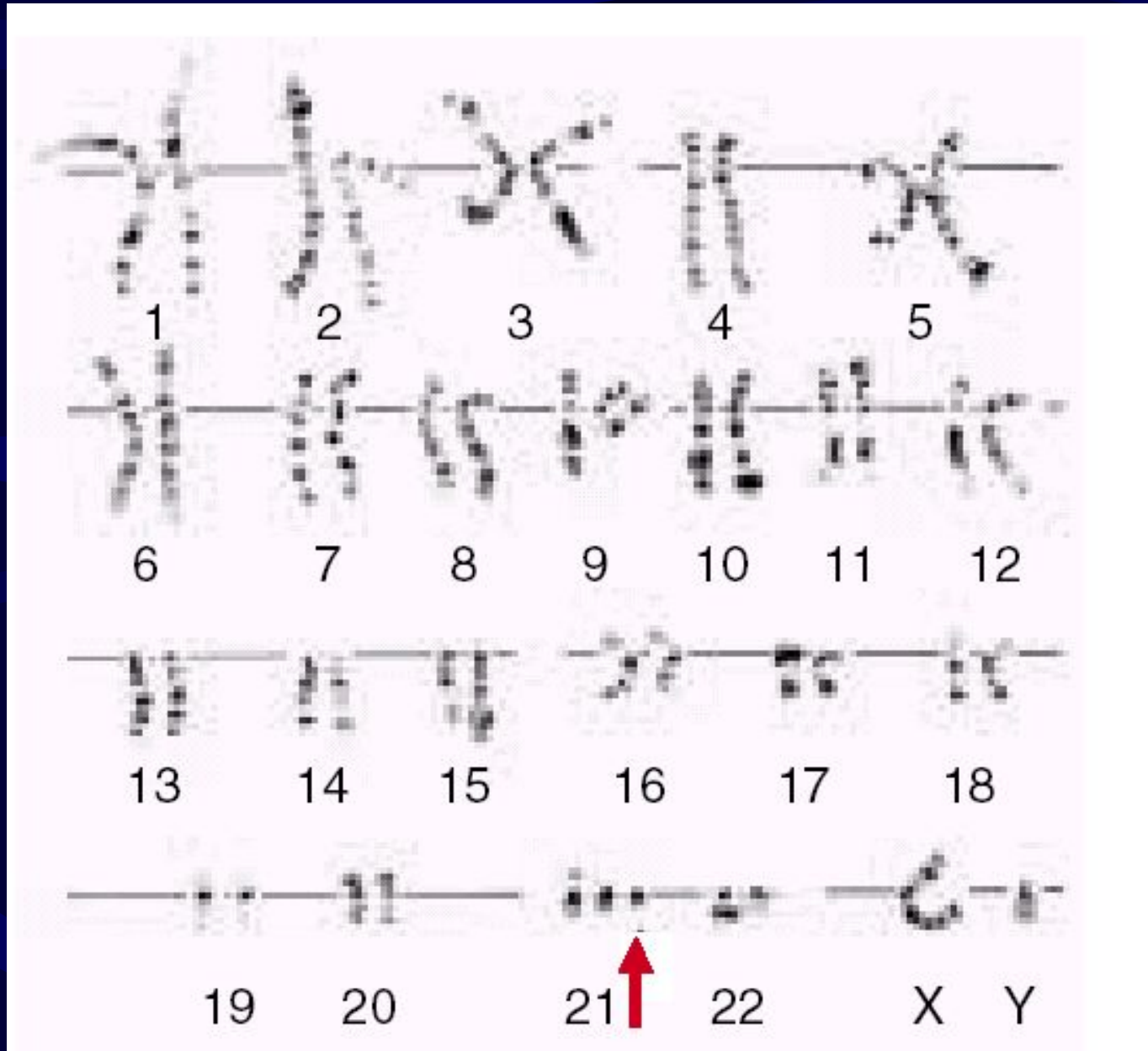
- **Q-окрашивание** — окрашивание по Касперссону акрихин-ипритом с исследованием под флуоресцентным микроскопом. Чаще всего применяется для исследования Y-хромосом.
- **G-окрашивание** — модифицированное окрашивание по Романовскому — Гимзе. Чувствительность выше, чем у Q-окрашивания, поэтому используется как стандартный метод цитогенетического анализа. Применяется при выявлении небольших aberrаций и маркерных хромосом (сегментированных иначе, чем нормальные гомологичные хромосомы)
- **R-окрашивание** — используется акридиновый оранжевый и подобные красители, при этом окрашиваются участки хромосом, нечувствительные к G-окрашиванию.
- **S-окрашивание** — применяется для анализа центромерных районов хромосом, содержащих конститутивный гетерохроматин.
- **T-окрашивание** — применяют для анализа теломерных районов хромосом.

Участки сильной и слабой конденсации по длине хромосомы специфичны для каждой хромосомы и имеют разную интенсивность окраски.



Метафазная пластинка (а) и кариотип (б) плода с трисомией хромосомы 21 (болезнь Дауна). Плацентобиопсия, второй триместр беременности. Окраска хромосом люминесцентным красителем "Хехст 33258". Увеличение в 1200 раз. Кариотипирование с помощью полуавтоматической системы анализа изображения "Видео-Тест" фирмы "Иста-Видео-Тест" (Санкт-Петербург)

Идиограмма при болезни Дауна, 47, +21



Кариотип 46; 5p-

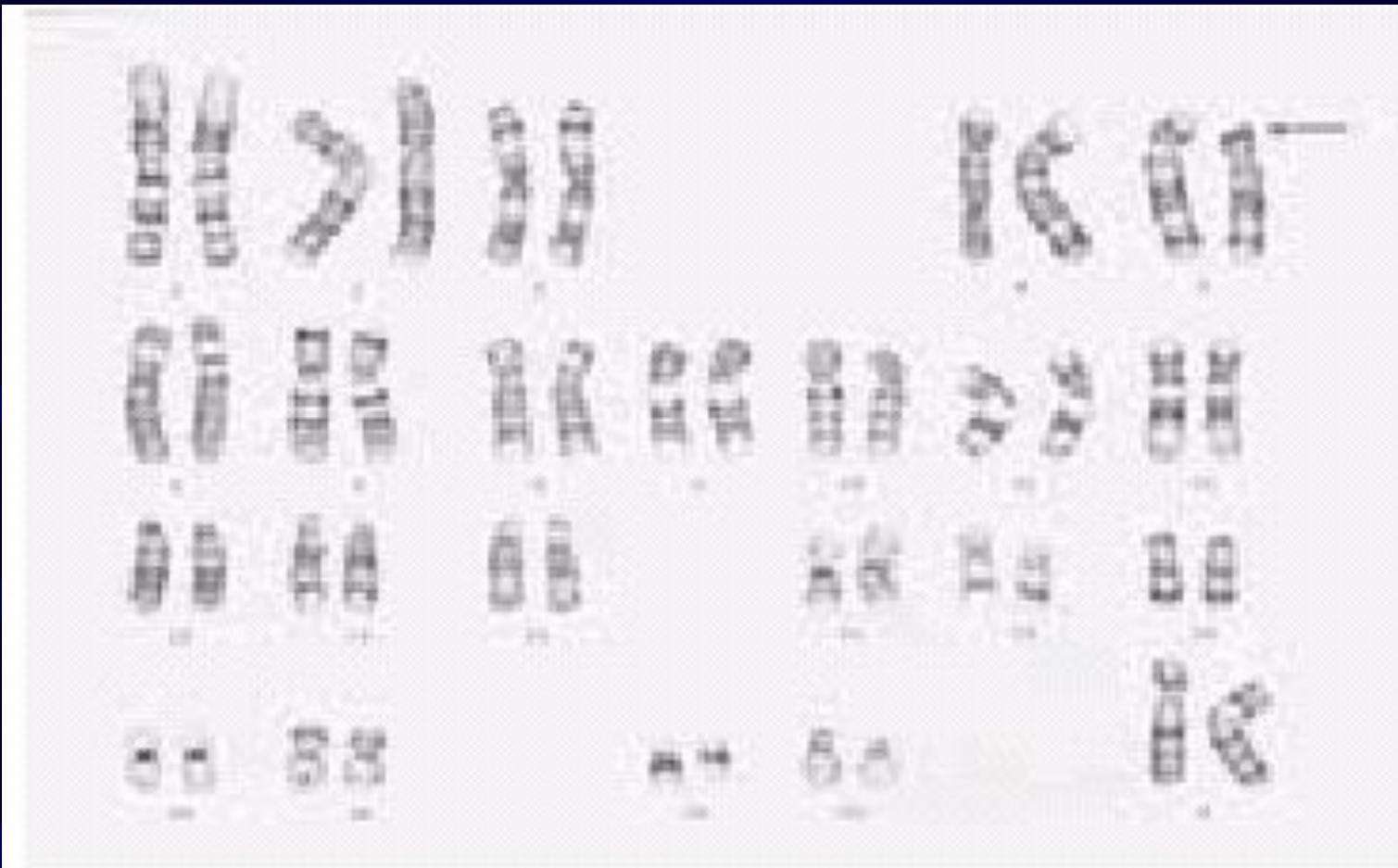


Figure 5.14 Cri du chat syndrome associated with deletion of short arm of chromosome 5 (courtesy of Dr Lorraine Gaunt and Helena Elliott, Regional Genetic Service, St Mary's Hospital, Manchester)

Идентификация транслокационной формы б.Дауна флуоресцентной окраской



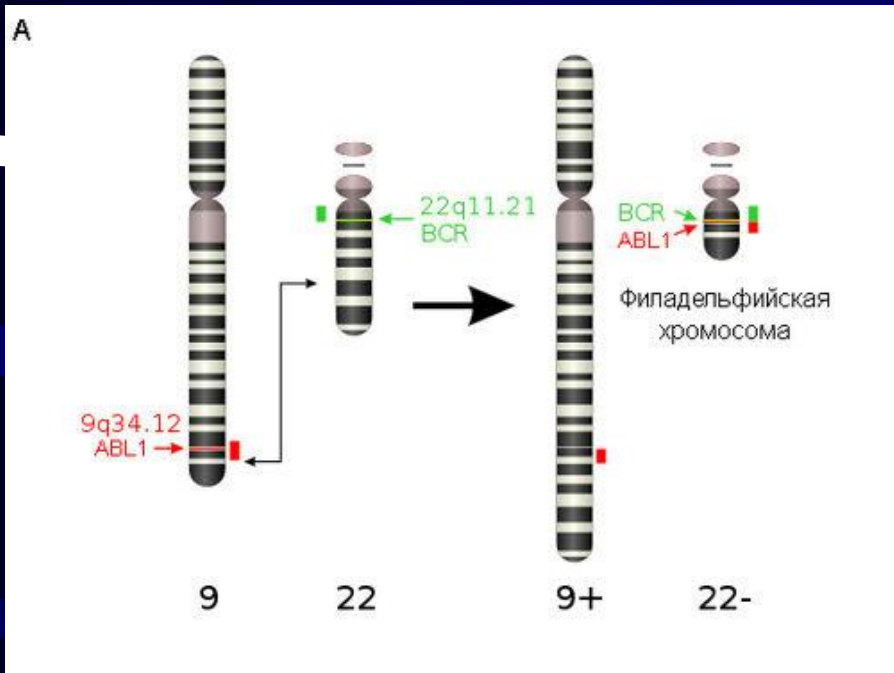
Флюоресцентная гибридизация in situ (Fluorescence in situ hybridization, FISH)

- спектральное кариотипирование, состоящее в окрашивании хромосом набором флуоресцентных красителей, связывающихся со специфическими областями хромосом. В результате такого окрашивания гомологичные пары хромосом приобретают идентичные спектральные характеристики, что существенно облегчает выявление таких пар и обнаружение межхромосомных транслокаций, то есть перемещений участков между хромосомами — транслоцированные участки имеют спектр, отличающийся от спектра остальной хромосомы.

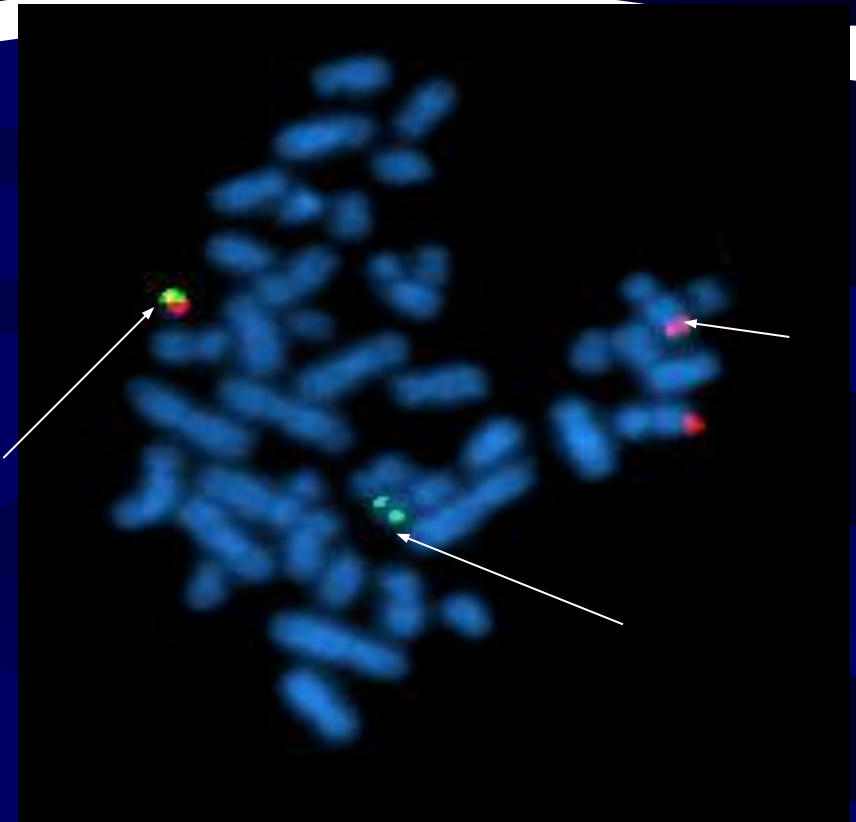
Флюоресцентная гибридизация in situ (Fluorescence in situ hybridization, FISH)

- Флюоресцентная гибридизация in situ, или метод FISH — цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах in situ.
- При флюоресцентной гибридизации in situ используют ДНК-зонды (ДНК-пробы), которые связываются с комплементарными мишенями в образце. В состав ДНК-зондов входят нуклеозиды, меченные флюорофорами (прямое мечение) или такими конъюгатами, как биотин или дигоксигенин (непрямое мечение).

Определение транслокации t(9;22)(q34;q11) при хроническом миелолейкозе методом FISH



ген ABL1 (хромосома 9) объединяется с геном BCR (хромосомы 22) – образуется химерный ген BCR-ABL1.

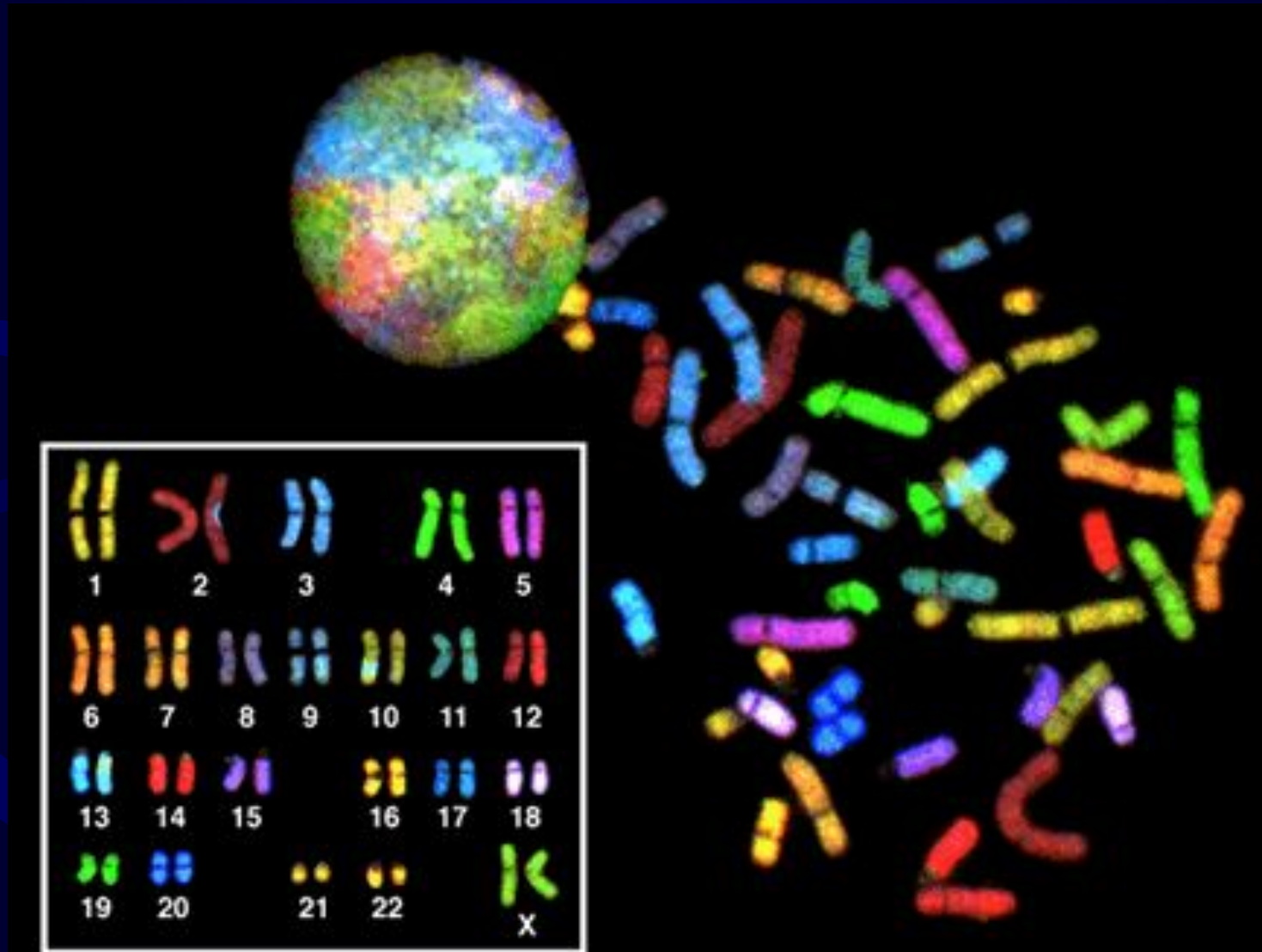


Метафазная пластинка с филадельфийской хромосомой. Хромосомы окрашены в синий цвет, локус ABL1 - красный цвет, локус BCR - зелёный цвет. Вверху слева - хромосома с перестройкой, отмечена красно-зеленой точкой.

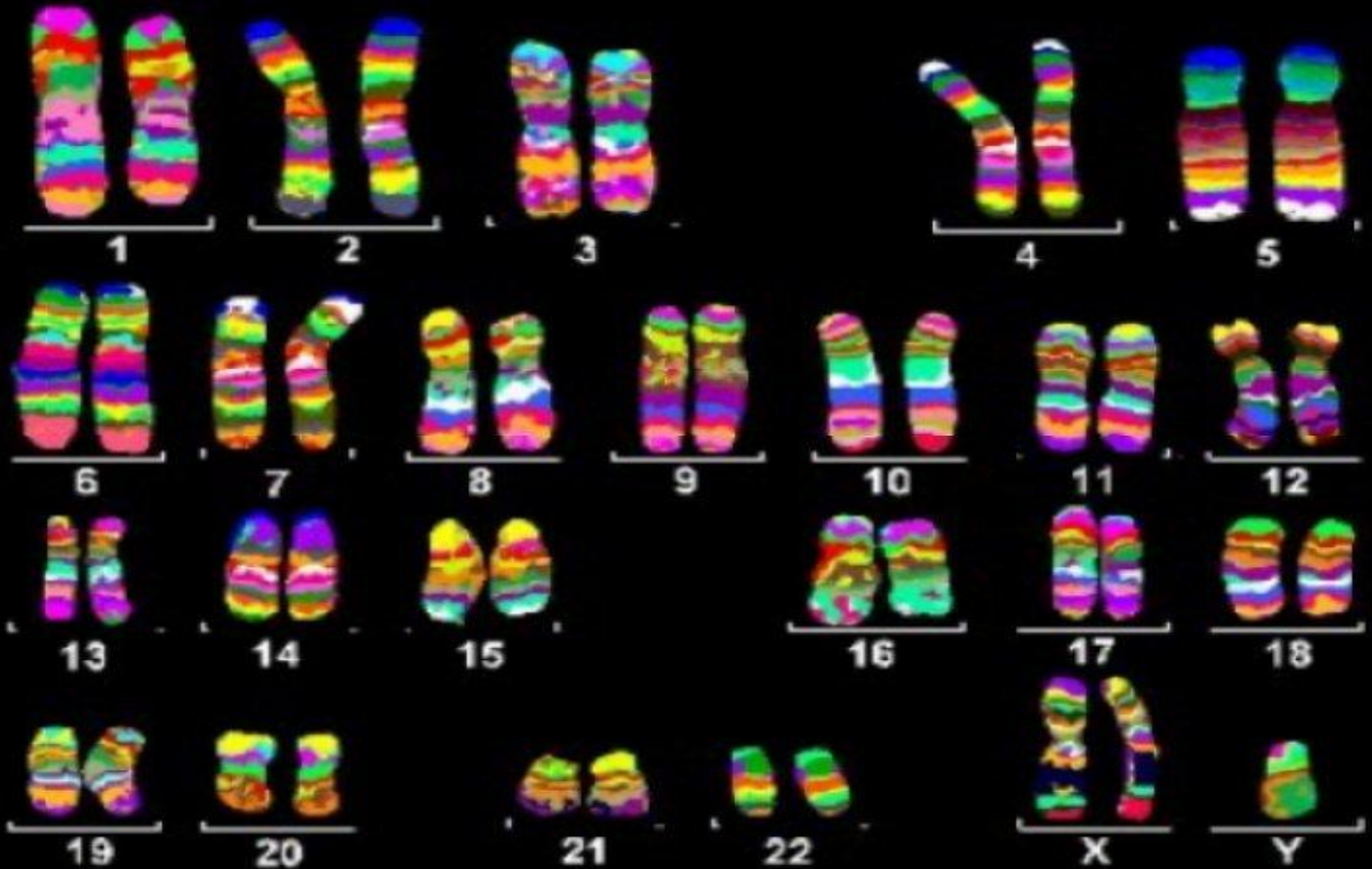
Многоцветная FISH

- спектральное кариотипирование, состоящее в окрашивании хромосом набором флуоресцентных красителей, связывающихся со специфическими областями хромосом. В результате такого окрашивания гомологичные пары хромосом приобретают идентичные спектральные характеристики, что существенно облегчает выявление таких пар и обнаружение межхромосомных транслокаций, то есть перемещений участков между хромосомами — транслоцированные участки имеют спектр, отличающийся от спектра остальной хромосомы.

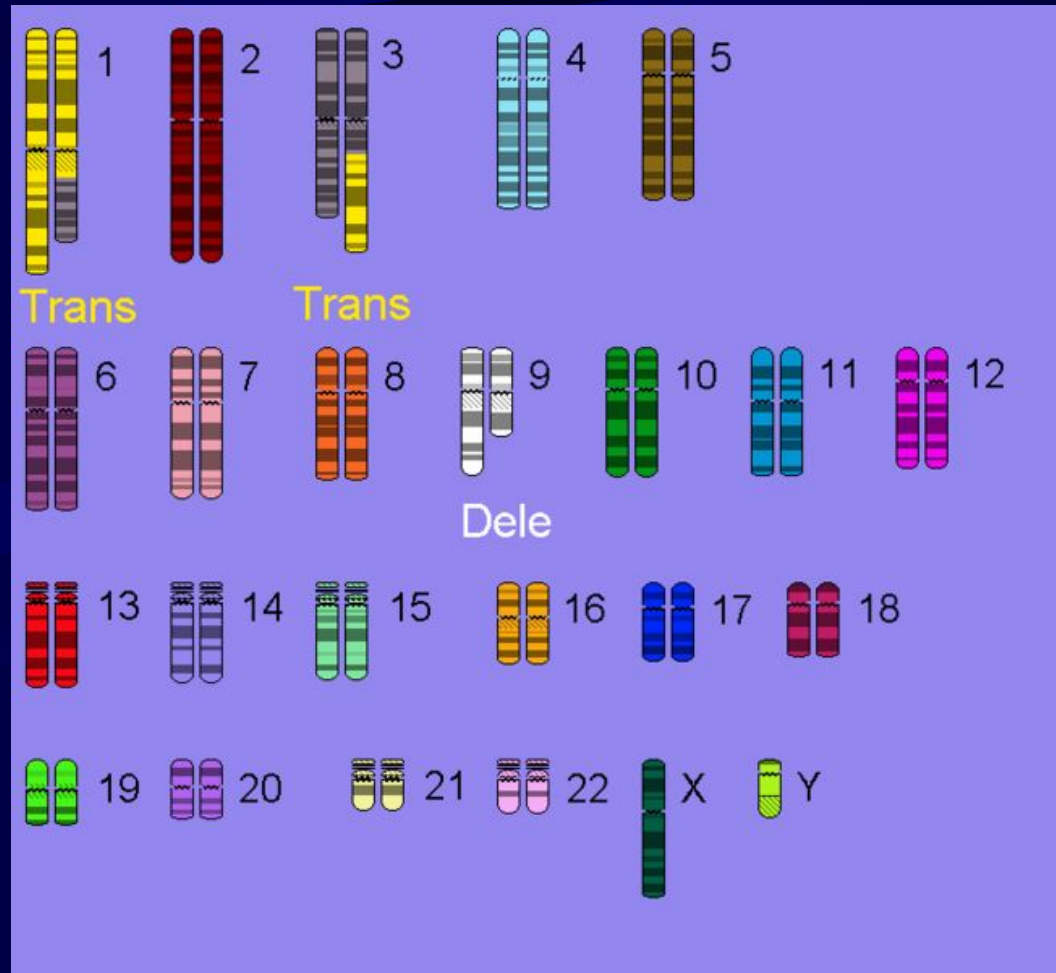
Кариотипирование при помощи многоцветной FISH



MultiColor Banding



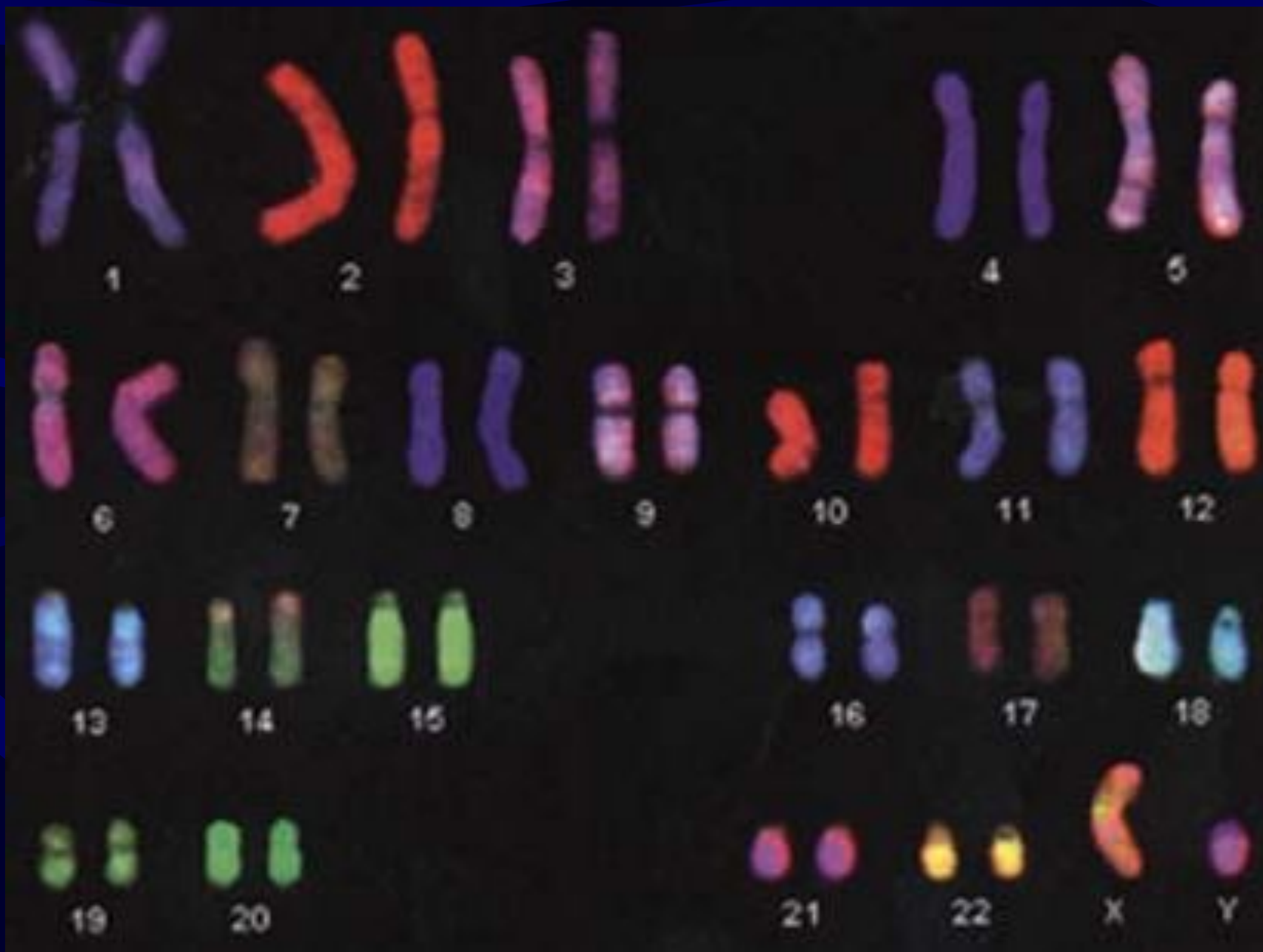
Кариотип 46,XY,t(1;3)(p21;q21), del(9)(q22)



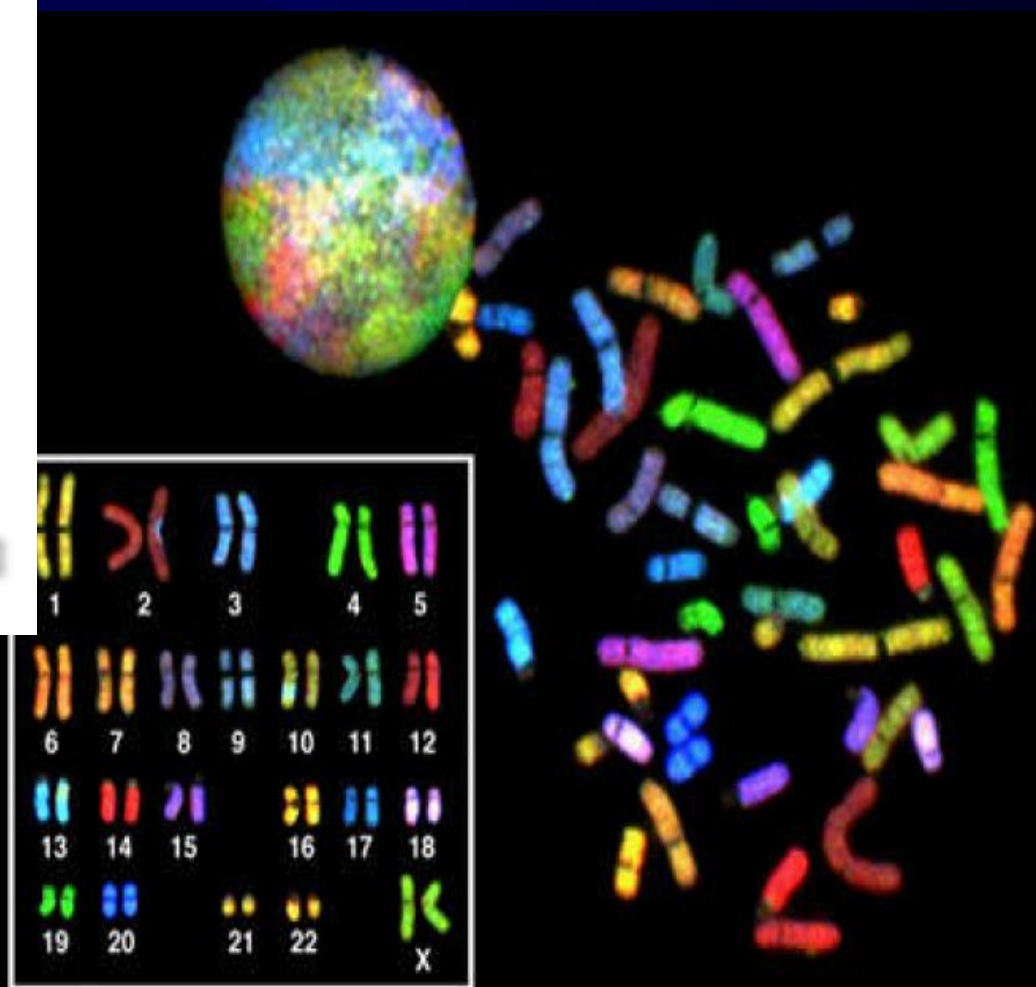
• Транслокация между 1-й и 3-й хромосомами, делеция 9-й хромосомы.

Маркировка участков хромосом дана как по комплексам поперечных меток (классическая кариотипизация, полосы), так и по спектру флуоресценции (цвет, спектральная кариотипизация).

Многоцветная FISH-окраска хромосом человека



Спектральное кариотипирование



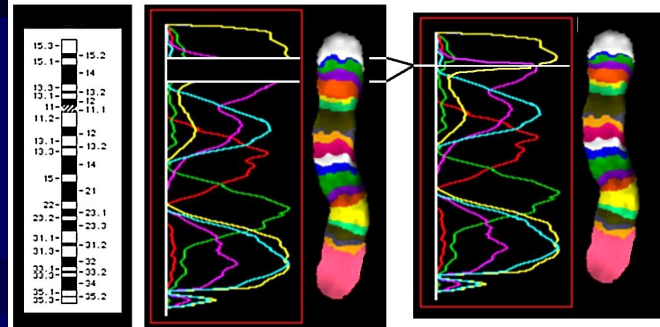
**Структурные хромосомные
перестройки
(МСВ, проблемы)**

**Делеция – ложноотрица-
тельный результат.**

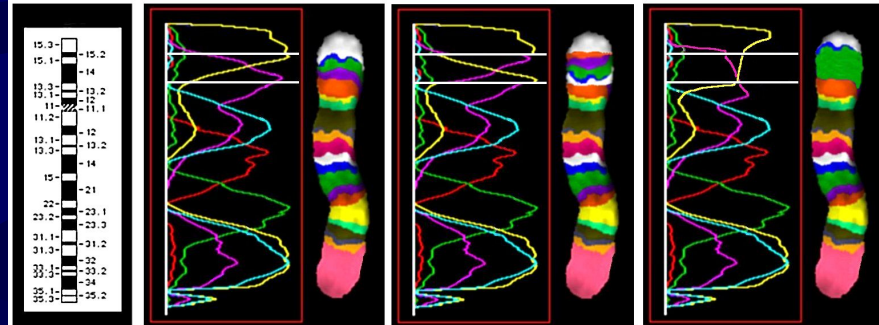
**Инверсия – имитация
комбинации делеции с
дупликацией.**

**Дупликация – имитация
комбинации делеции с
дупликацией.**

Делеция 5p15.1-p14



Инверсия 5p15.1-p14



Дупликация 5p15.1-p14

