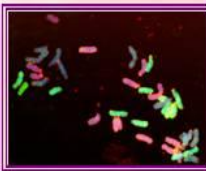


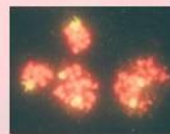
# Современные методы молекулярно-цитогенетического исследования кариотипа человека

## Молекулярная цитогенетика

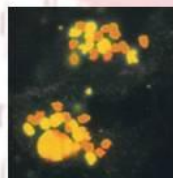
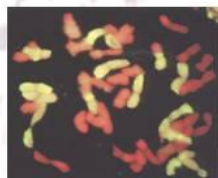
Геномная *in situ* гибридизация (GISH)- Мощный инструмент изучения поведения родительских геномов в межвидовых гибридах растений



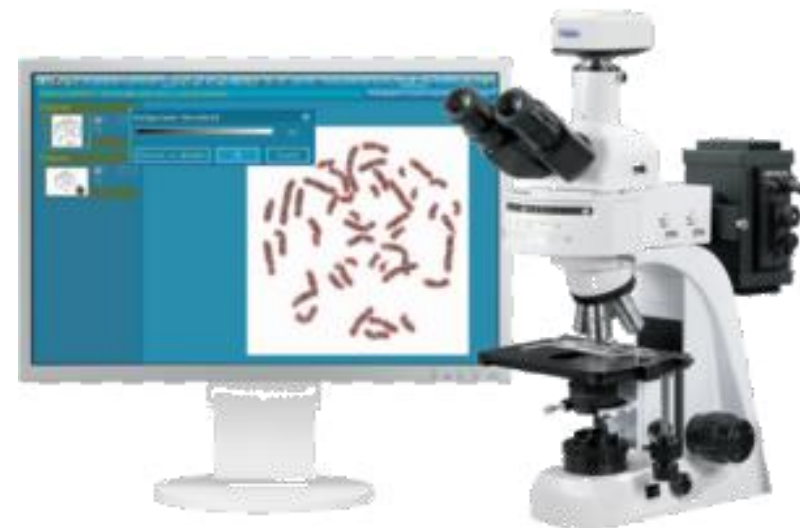
ЛИЛИИ



ТОМАТ



ТРИТИКАЛЕ



- **Цитогенетический метод** - цитогенетический анализ кариотипа человека в норме и патологии.
- Суть этого метода заключается в изучении **строения** отдельных хромосом, а так же **особенностей набора** хромосом клеток человека в норме и патологии.
- Удобным объектом для этого служат лимфоциты, клетки эпителия щеки и другие клетки, которые легко получать, культивировать и подвергать кариологическому анализу. **Выбор объекта определяется целью исследования.**
- Также цитогенетический метод является важным методом определения пола и хромосомных наследственных заболеваний человека.

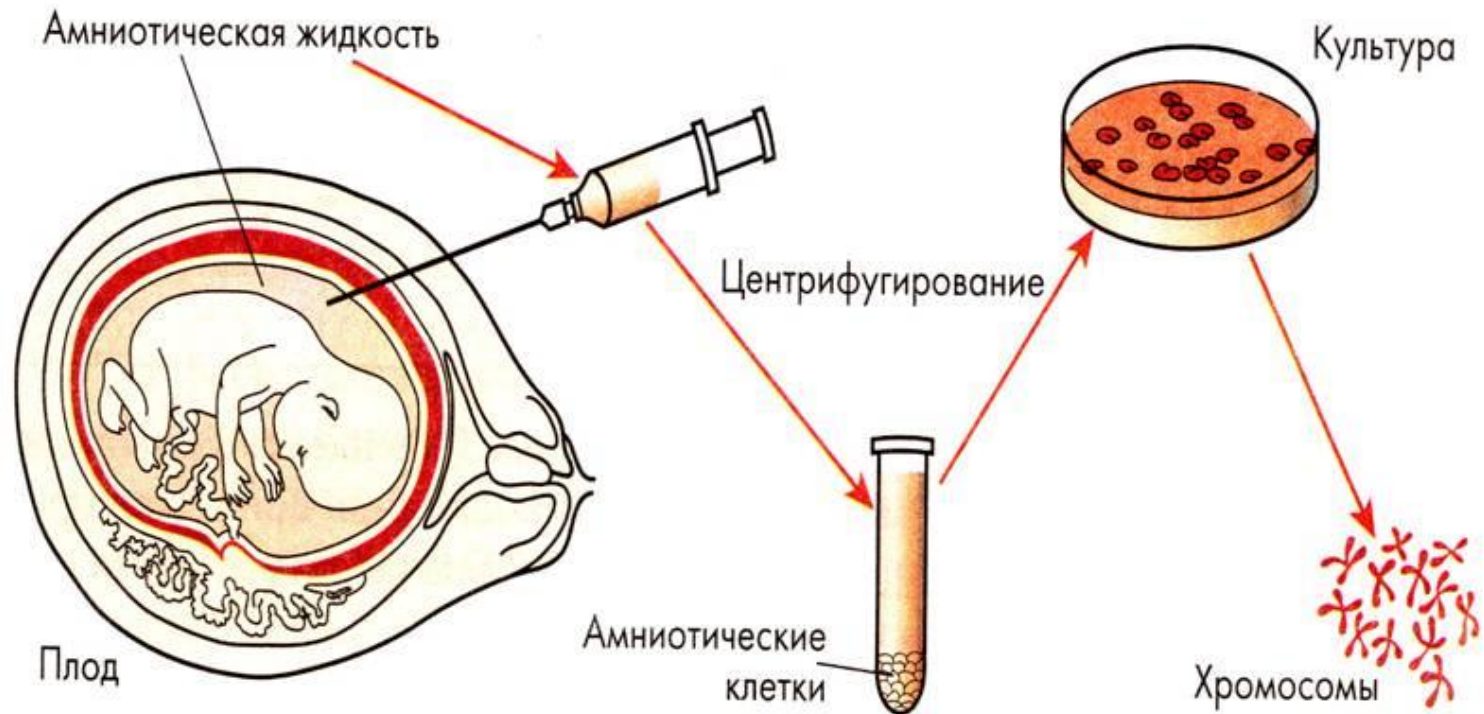
- Хромосомные перестройки могут приводить к мужскому и женскому **бесплодию, проблемам невынашивания беременности, врожденным порокам развития плода.**
- При помощи анализа на кариотип можно определить патологии в хромосомном наборе супругов — моносомия, трисомия, делеция, транслокация, мозаицизм и т. д.
- Кариотип плода с высокой точностью покажет на изменения, которые вызывают заболевания: синдромы Клайнфельтера, Прадера-Вилли, Эдвардса, Дауна, Патау, Шерешевского — Тёрнера, аутизм и прочие пороки развития.

- **Кариотипирование** - это тест для изучения хромосом, который может помочь выявить генетические проблемы, ставшие причиной расстройства или заболевания.
- Кариотипирование делается, чтобы:
  - — Определить наличие аномальных хромосом у плода.
  - — Определить причину врожденных дефектов ребенка.
  - — Определить, наличие аномальных хромосом у взрослого человека и рассмотреть варианты, как они могут повлиять на развитие его будущего ребенка.
  - — Определить, являются ли аномальные хромосомы причиной выкидыша или бесплодия женщины.

# ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА КАРИОТИПА ЧЕЛОВЕКА

- в середине 1950-х гг. происходит развитие новой области генетики - цитогенетики человека и ее подразделов - **клинической цитогенетики, онкоцитогенетики, пренатальной цитогенетики.**
1. Основной задачей клинической цитогенетики является анализ кариотипа у пациентов с различными (изолированными и множественными) врожденными пороками развития.
  2. Задачи онкоцитогенетики касаются исследования корреляций онкологического процесса с хромосомными аномалиями в опухолевых клетках.
  3. В задачи пренатальной цитогенетики входят диагностика хромосомных болезней и изучение функциональной активности отдельных хромосом и их сегментов в период внутриутробного развития человека.

# Метод пренатальной диагностики (амниоцентез)



Метод пренатальной диагностики наследственных заболеваний

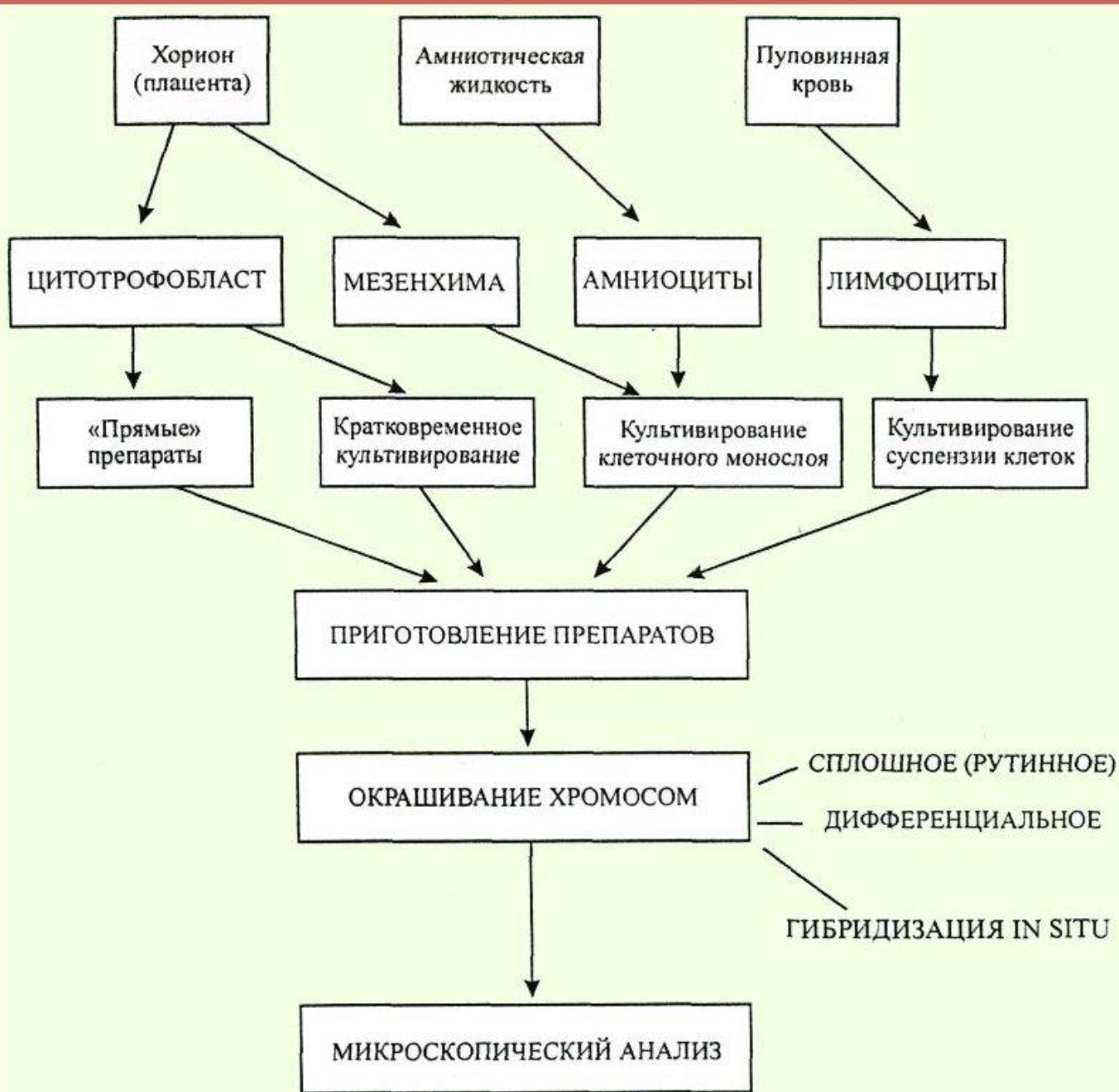


Рис. 13.7. Принципы цитогенетической пренатальной диагностики

- По мере развития методов цитогенетического анализа их арсенал неуклонно увеличивался, и в настоящее время возможно изучение всего хромосомного набора или отдельных хромосом в клетках практически любых тканей и органов, на любой стадии клеточного цикла, в митозе и мейозе.
- В зависимости от целей исследования различают **прямые и непрямые методы** исследования хромосом.



# Прямые методы

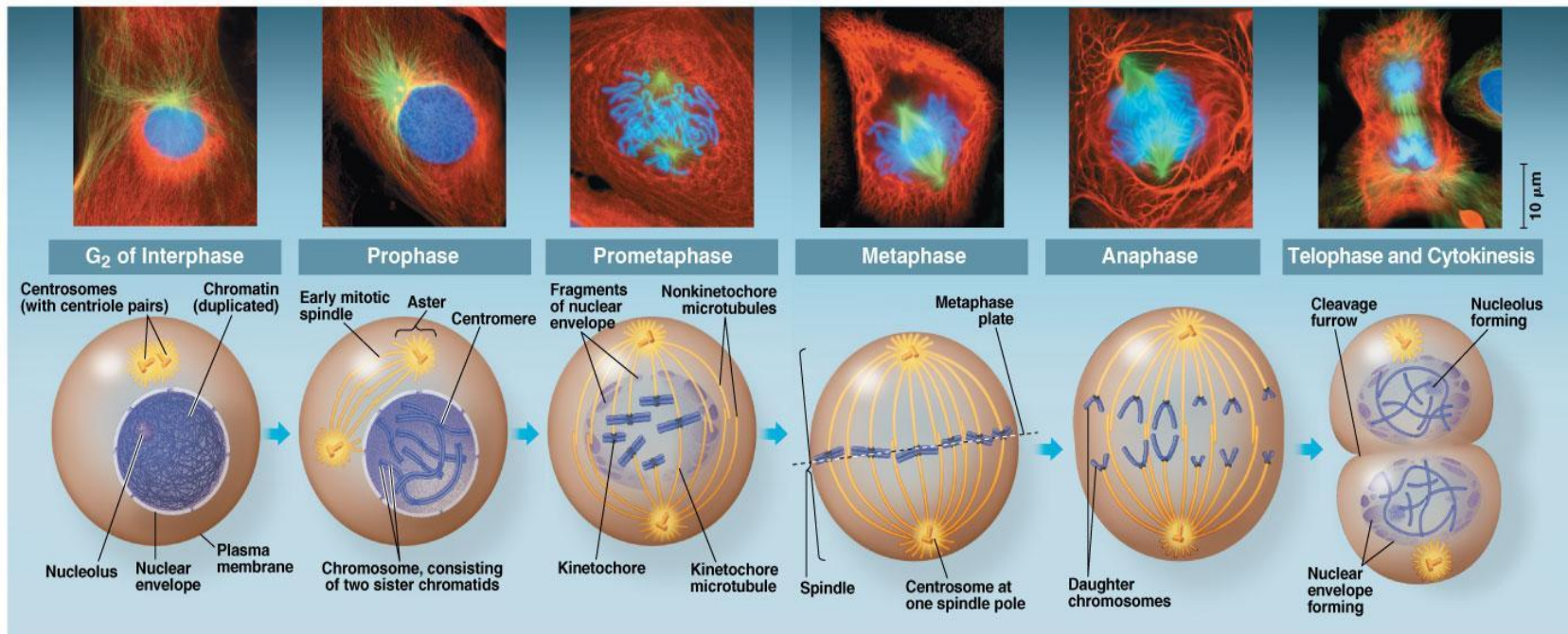
- Прямые методы применяются в тех случаях, когда необходим быстрый результат и имеется возможность получить препараты хромосом клеток, делящихся в организме. Источником таких клеток является **костный мозг и клетки зародышевых оболочек**. Основным объектом цитогенетического исследования прямыми и непрямыми методами являются стадия **метафазы митоза и различные стадии мейоза**. Метафаза митоза служит основным объектом для анализа хромосомного набора, т.к. именно на этой стадии возможна точная идентификация хромосом и выявление их аномалий.

# Непрямые методы

- Непрямые методы включают в качестве обязательного этапа **культивирование клеток в искусственных питательных средах**. Материалом являются лимфоциты периферической крови и пуповинной крови плода, фибробласты кожи и амниотической жидкости, клетки спонтанно abortируемых эмбрионов и зародышевых оболочек.

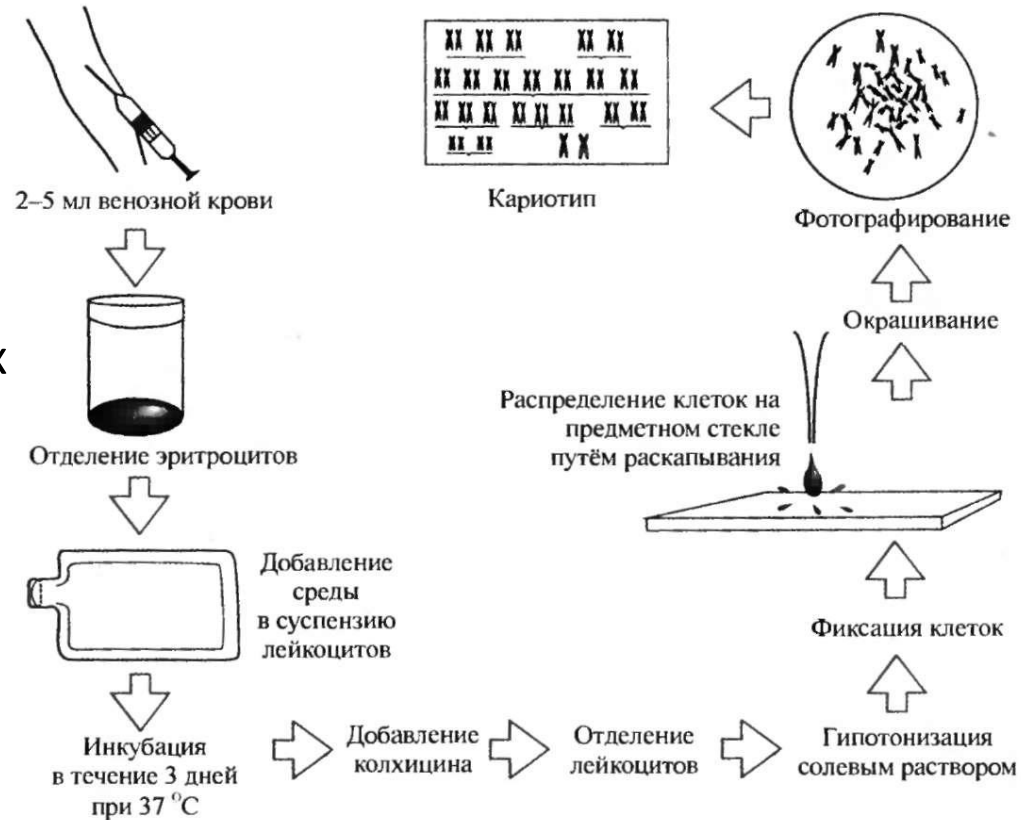
## В зависимости от стадии клеточного цикла проводят исследования:

- отдельных хромосом или их участков в интерфазных ядрах
- профазных хромосом (анализ на стадии пахитены в сперматогенезе);
- прометафазных митотических хромосом (анализ на высоком уровне разрешения);
- метафазных хромосом (традиционный анализ ФГА(фитогемагглютинин)-стимулированных лимфоцитов и реже - клеток костного мозга, фибробластов кожи и др.);
- стадий анафазы - телофазы (для регистрации специфического воздействия различных агентов на хромосомы путем оценки частоты клеток с мостами и фрагментами).



# Основные этапы анализа хромосом

- 1. Использование **колхицина** или других агентов - ингибиторов образования веретена, останавливающих клеточный цикл на стадии метафазы.
- 2. Гипотоническая обработка - вызывает набухание клетки, разрушение межхромосомных связей, что способствует отделению хромосом друг от друга.
- 3. Фиксация - сохраняет структуру хромосом и удаляет остатки цитоплазмы.
- 4. Окрашивание препаратов.



**В зависимости от задач исследования препараты хромосом можно анализировать одним из следующих способов.**

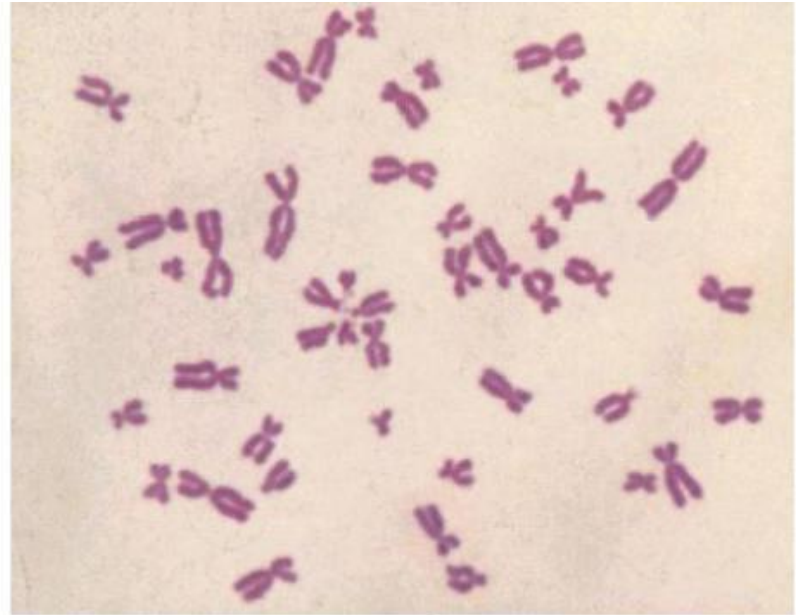
- 1. Анализ с помощью **фазового контраста**. Позволяет оценить митотический индекс и качество метафазных пластинок на препарате.
- 2. **Сплошное (рутинное) окрашивание хромосом**. Применяется для анализа численных аномалий кариотипа и при специальных исследованиях хромосомных aberrаций (хромосомных и хроматидных разрывов, мостов и фрагментов).
- 3. **Дифференциальное окрашивание хромосом**. Для идентификации хромосом и анализа их морфофункциональных особенностей используются различные методы дифференциальной окраски.
- 4. **Флюоресцентная гибридизация in situ (FISH)**. Метод основан на использовании хромосомспецифических ДНК-зондов, их гибридизации на хромосомных препаратах и детекции сигнала с помощью микроскопа.

## Простая окраска.

Используется для **ориентировочного определения числовых аномалий кариотипа.**

Выявляемые структурные хромосомные аномалии (**делеции, транслокации, инверсии**) идентифицируются с помощью дифференциальной окраски.

Применяется для изучения **хромосомного мутагенеза** (учет хромосомных aberrаций) при проверке факторов окружающей среды на мутагенность.

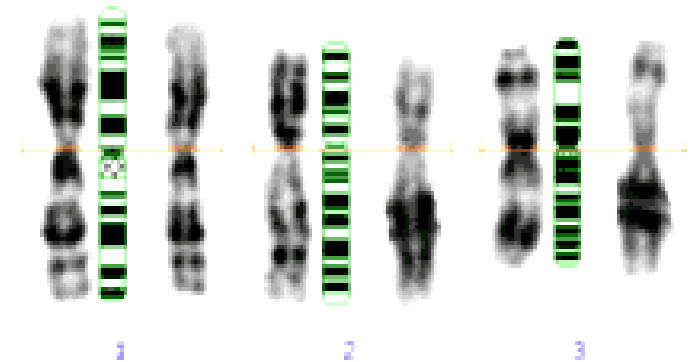
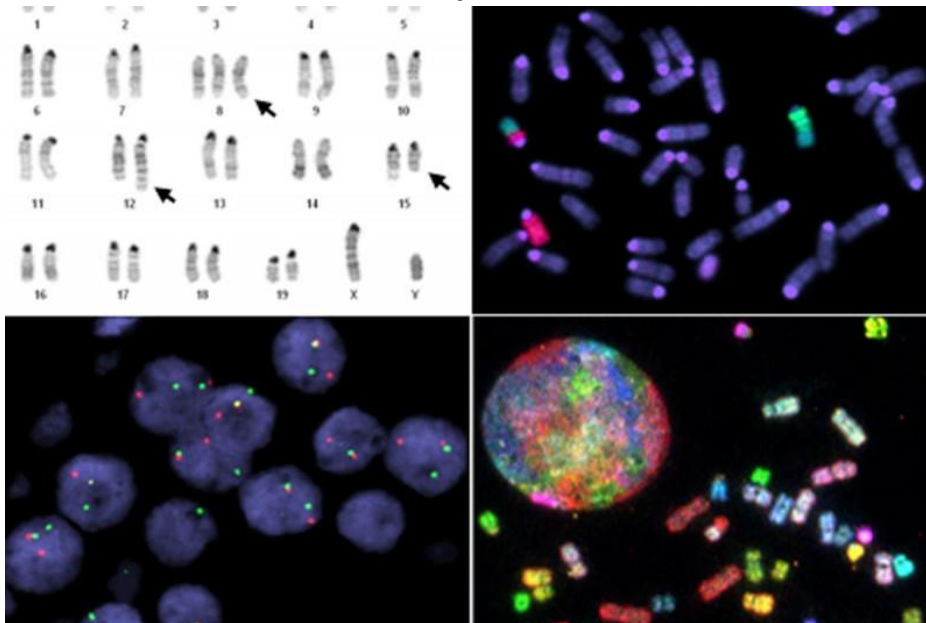


# Дифференциальное окрашивание хромосом:

(бэндинг) выявляет комплекс поперечных меток (полос, бэндов) на хромосоме.

Каждая хромосома характеризуется специфическим комплексом полос.

Гомологичные хромосомы окрашиваются **идентично**, за исключением полиморфных районов, где локализуются разные аллельные варианты генов.



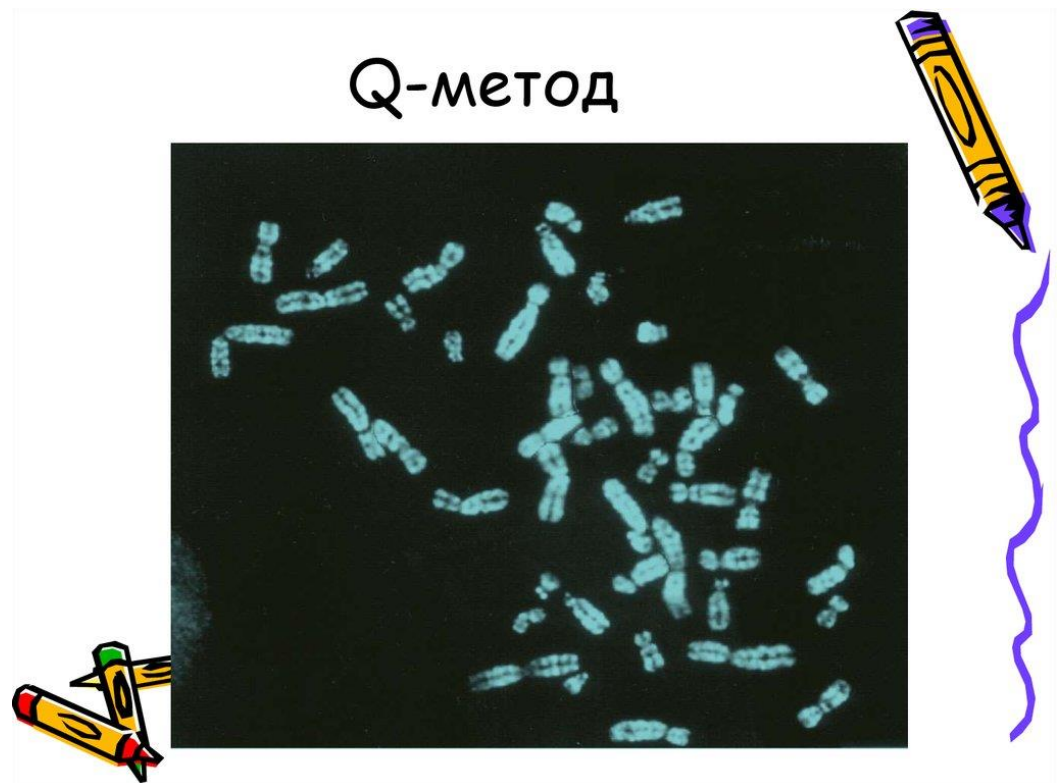


**Q-окрашивание.** (флюоресцентное алкилирующее вещество акрихиниприт)

Требует быстрой обработки препарата.

Просмотр препарата в люминесцентный микроскоп

Лучше всего подходит для исследования **Y-хромосом** и используется для быстрого определения генетического пола, выявления транслокаций (обменов участками) между X- и Y-хромосомами или между Y-хромосомой и аутосомами.

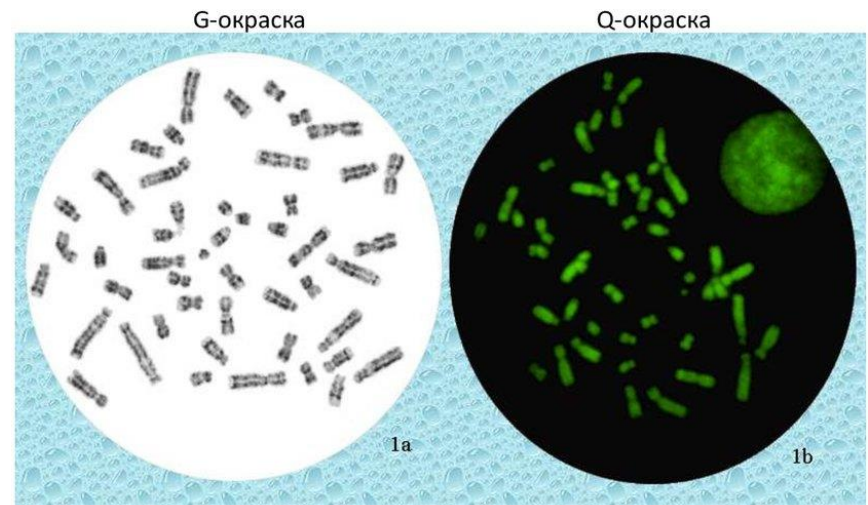




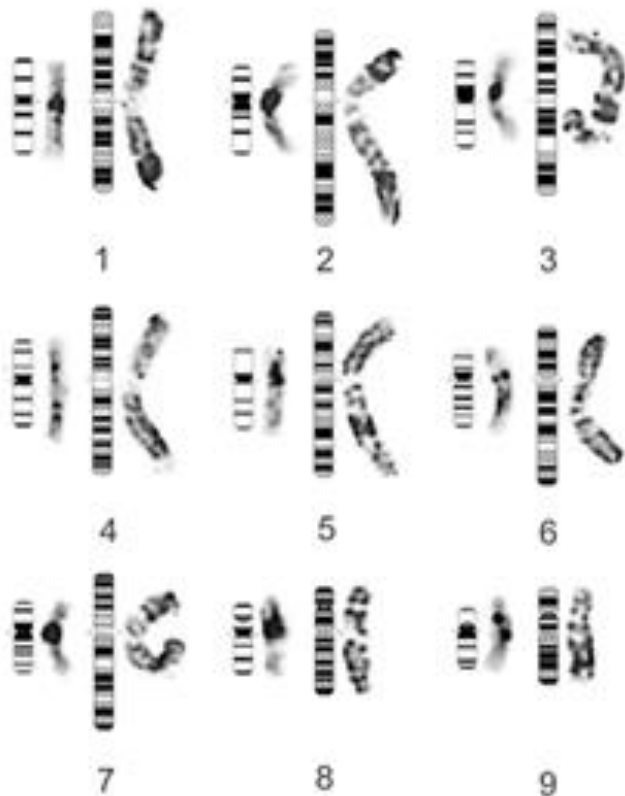
**G-окрашивание.** G-окрашивание выявляет небольшие аберрации и маркерные хромосомы (сегментированных иначе, чем нормальные гомологичные хромосомы). В случаях сложных хромосомных перестроек, захватывающих более двух хромосом, не позволяет идентифицировать измененные сегменты.



Т. Касперсон и другие – методы дифференциальной окраски хромосом (1968 – 70гг.)



**R-окрашивание** дает картину, противоположную G-окрашиванию. Этим методом выявляют различия в окрашивании гомологичных G- или Q-негативных участков сестринских хроматид или гомологичных хромосом.



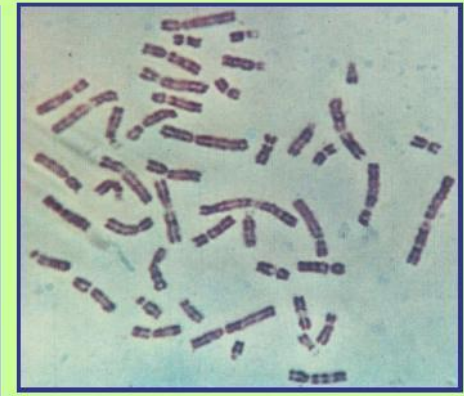
## Хромосомы человека

Различные виды дифференциальной окраски:

*C- окраска*



*R- окраска*

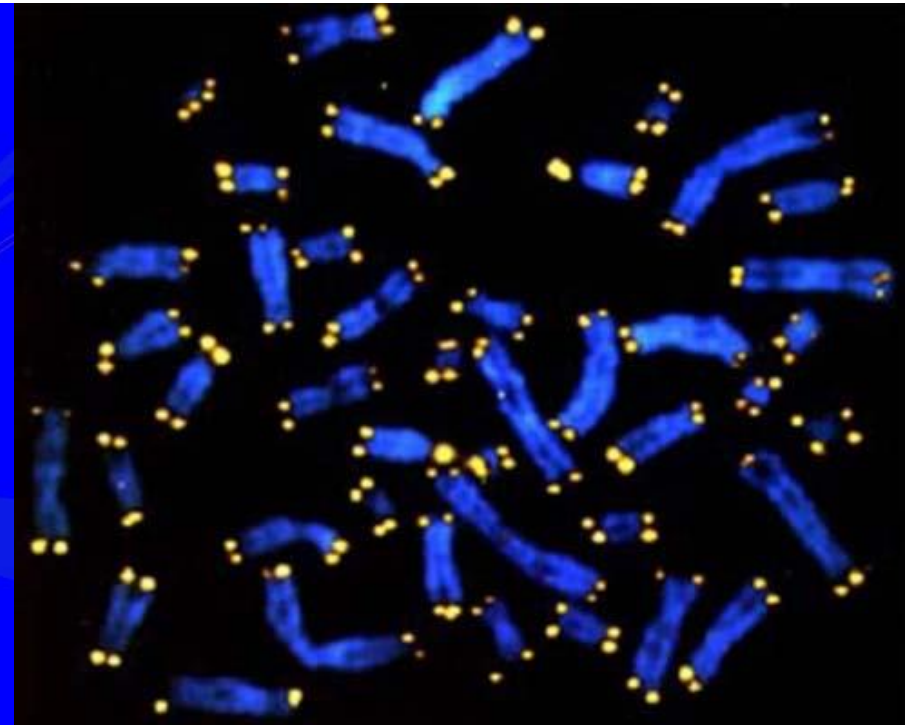
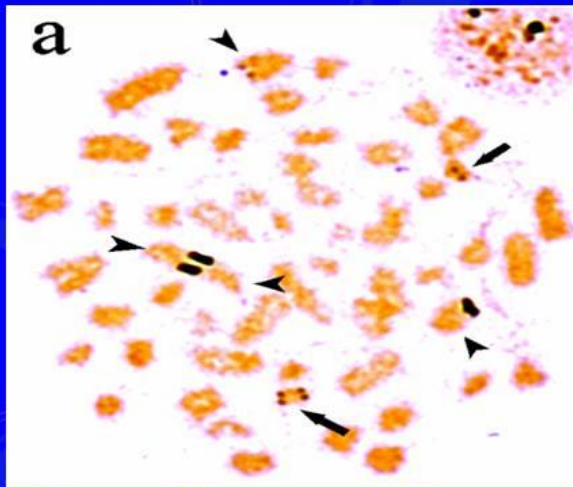


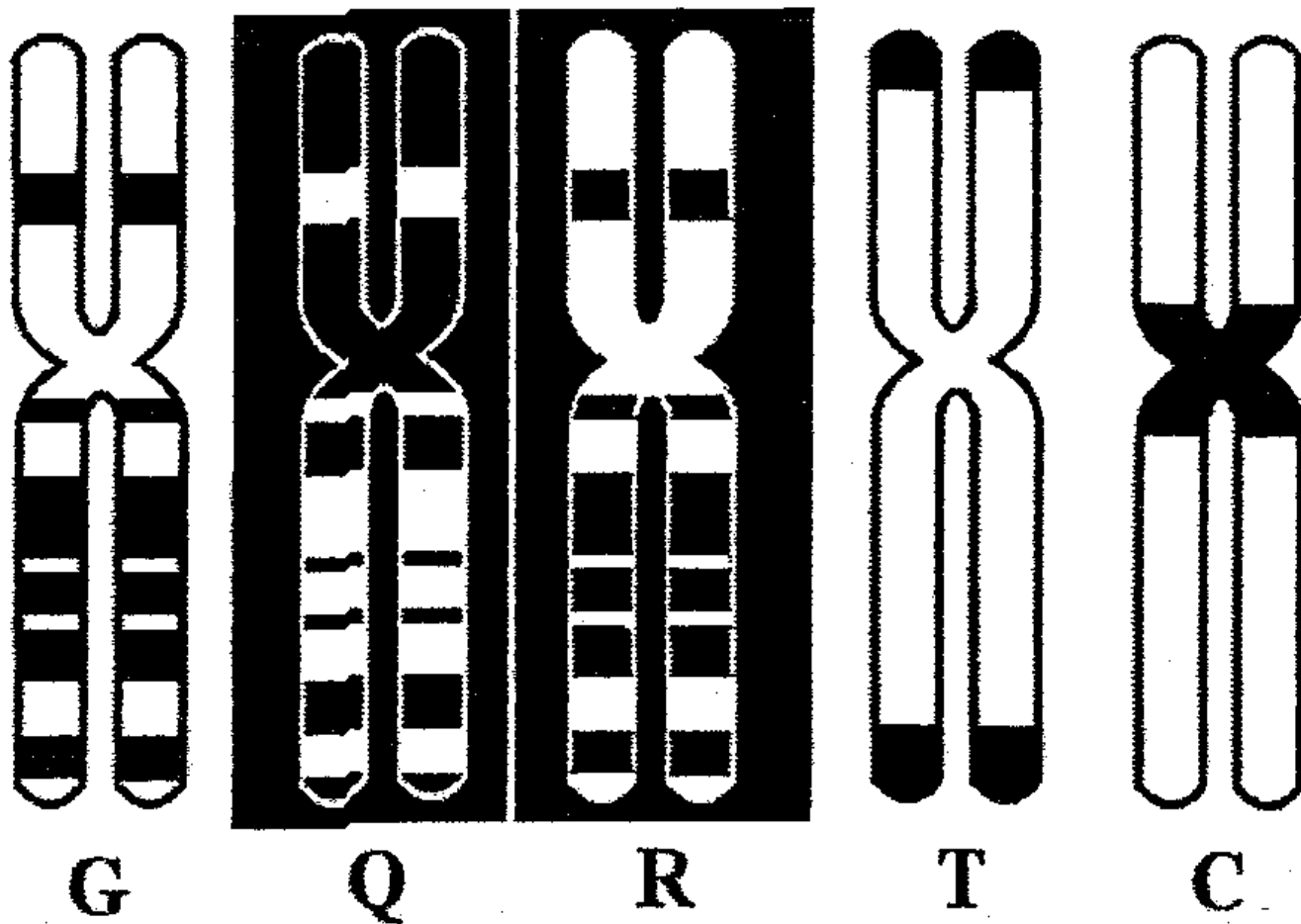
**C-окрашивание** используют для анализа центромерных районов хромосом (эти районы содержат конститутивный гетерохроматин) и варибельной, ярко флюоресцирующей дистальной части Y-хромосомы.

**T-окрашивание** применяют для анализа **теломерных** районов хромосом.

### NOR-окраска

Окраска препаратов раствором нитрата серебра, необходима для выявления районов ядрышковых организаторов.





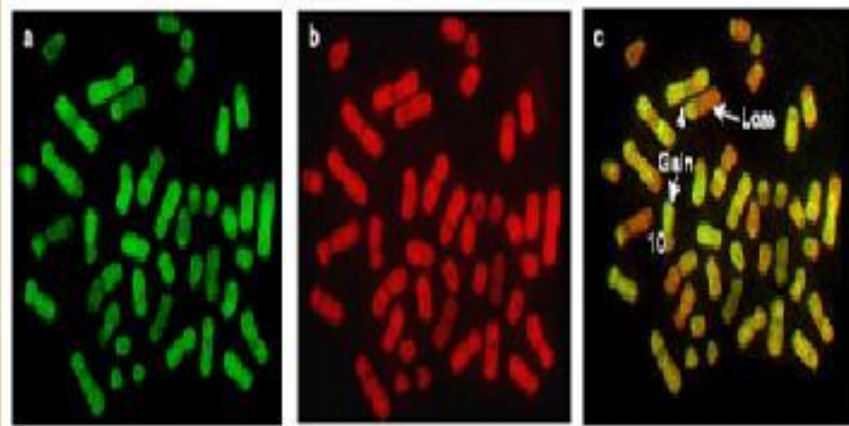
**Чередование бэндов в хромосоме X, полученное разными методами дифференциальной окраски.**



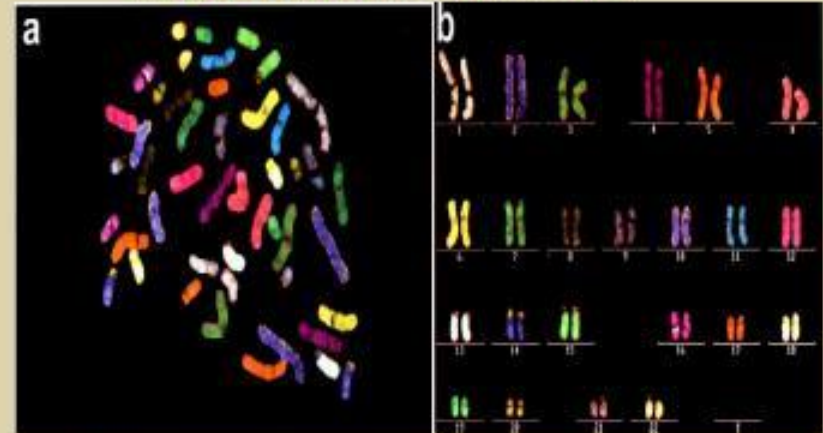
# Лаборатория молекулярной цитогенетики

Современные методы молекулярно-цитогенетических исследований

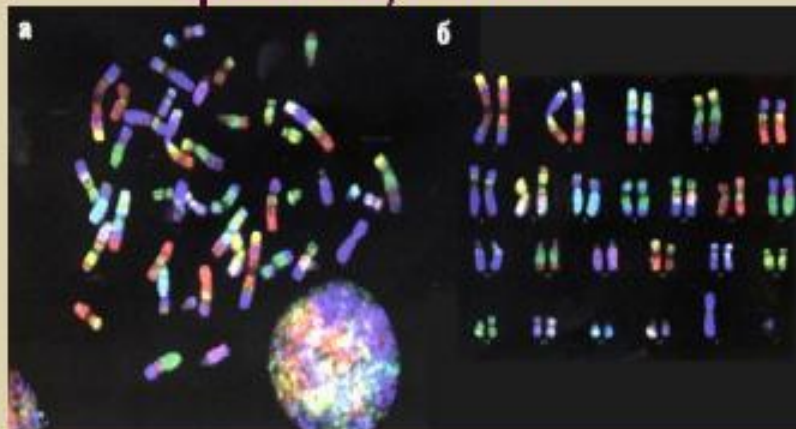
**Сравнительная геномная  
гибридизация, CGH**



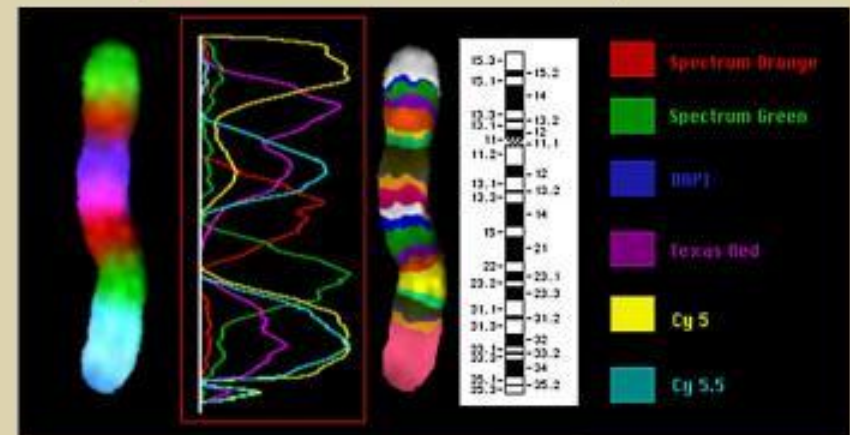
**Спектральное  
кариотипирование, SKY**



**Межвидовое сегментирование  
хромосом, RxFISH**



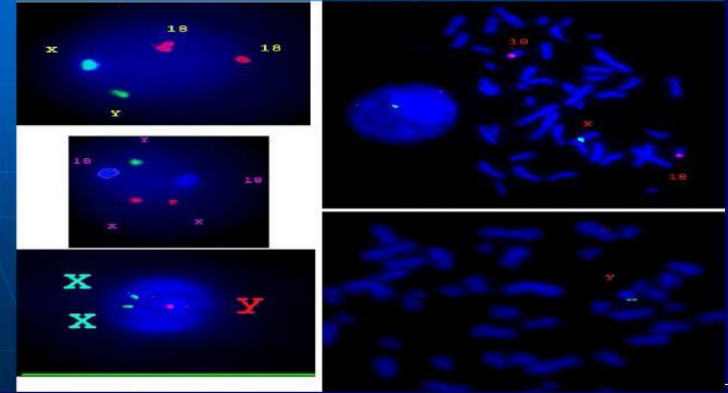
**Многоцветное окрашивание  
хромосомы 5 человека, MCB**



- **Метод FISH- флуоресцентная гибридизация *in situ* - включает следующие этапы:**
- - создание зондов - однонитевых фрагментов ДНК, к которым присоединяют биотин или дигоксигенин; зонды могут быть комплементарны хромосоме или ее конкретному участку;
- - щелочная обработка препаратов *in situ* с целью денатурации хромосомной ДНК за счет разрыва водородных связей между двумя цепями ДНК;
- - *гибридизация* хромосомной ДНК с зондом путем комплементарного связывания зонда со специфической последовательностью хромосомы;
- - обработка препаратов веществами, которые избирательно связываются с биотином и дигоксигенином к этим веществам могут быть присоединены флуоресцентные красители
- - *визуализация хромосом* с помощью люминесцентного микроскопа на фоне неокрашенных хромосом.

## Молекулярная цитогенетика

### FISH исследование интерфазных и метафазных хромосом с помощью ДНК зондов



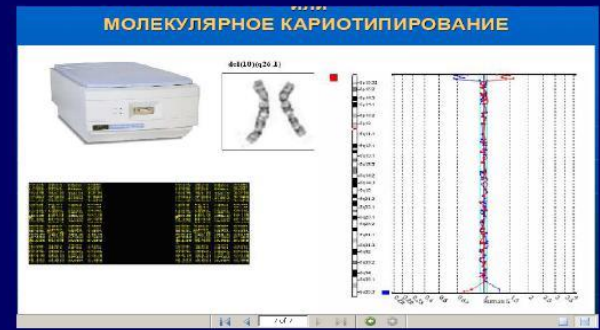
### Метод FISH используется для выявления:

- - численных хромосомных аномалий в интерфазном ядре;
- - структурных аномалий;
- - сложных межхромосомных перестроек;
- - учета симметричных aberrаций у облученных лиц;
- - локализации гена.
- быстрого установления пола,
- выявления трисомии

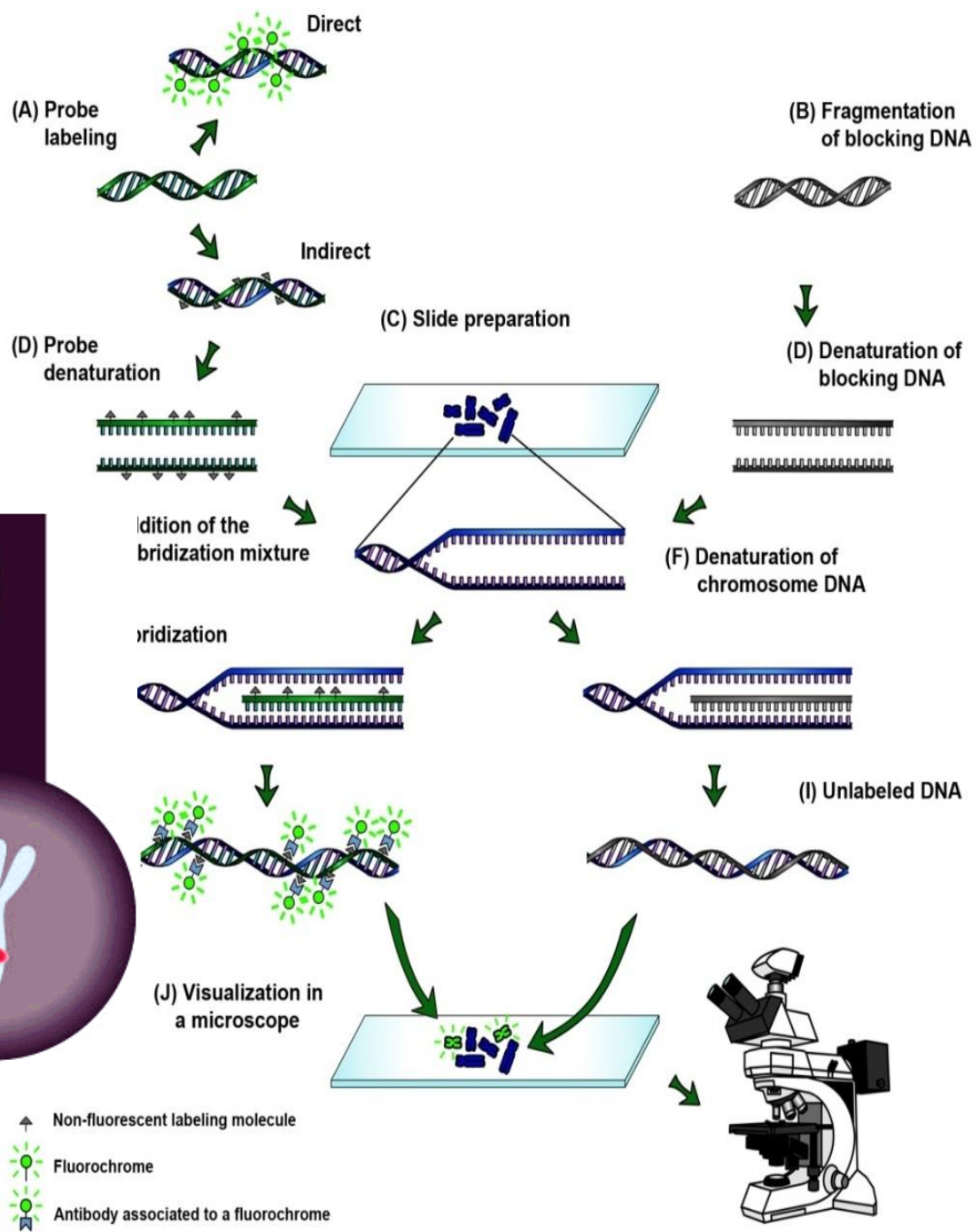
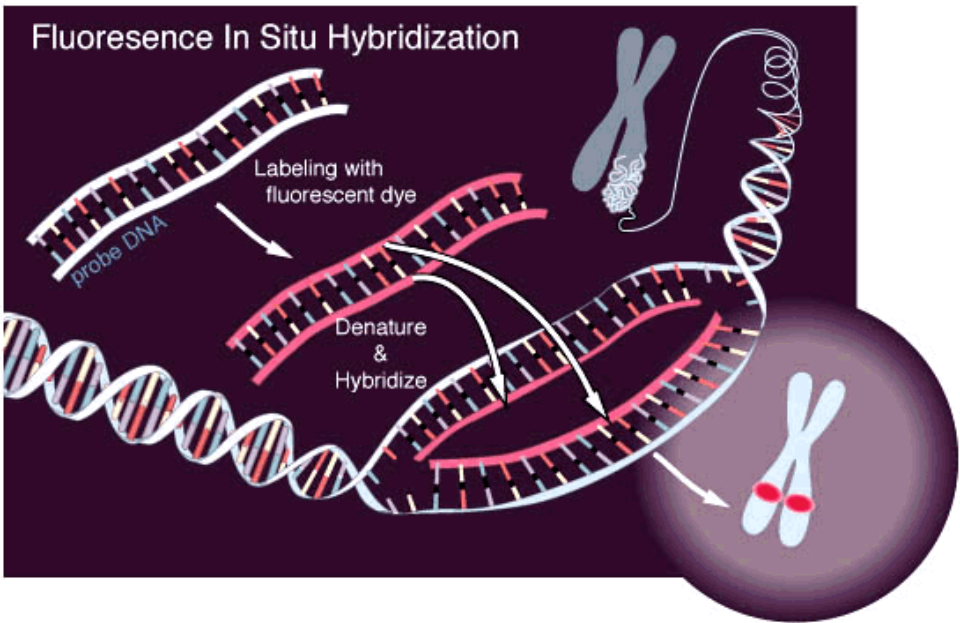
и других анеуплоидий в интерфазных клетках,

- цитогенетического анализа опухолевых клеток.
- Этот достаточно простой, точный, быстрый и экономичный метод находит все более широкое применение в диагностике врожденных аномалий, моногенных синдромов, в том числе, в пренатальной диагностике.

## Молекулярное кариотипирование или сравнительная геномная гибридизация









# Многоцветная FISH-окраска хромосом человека



## **Метод сравнительной геномной гибридизации** (comparative genome hybridization - **CGH**)

- объединяет стандартную цитогенетическую методику кариотипирования и FISH-анализ.
- Область использования - онкологическая цитогенетика, назначение - определение районов хромосом, которые делетируются или амплифицируются.
- Из опухоли выделяют ДНК и метят ее определенным флюорохромом.
- ДНК, выделенную из нормальной ткани, метят другим флюорохромом.
- Меченую ДНК из опухоли и неизмененной ткани гибридизуют с исследуемым хромосомным препаратом.
- По интенсивности свечения метки определяют области делеций и амплификаций.
- Используют программы компьютерного анализа хромосом.

## Достоинства CGH :

- не зависит от источника исследуемого материала, и может быть успешно проведен с малым количеством тестируемой ДНК, включая архивный материал.
- позволяет получить детальную информацию о потерях или увеличении числа копий генетического материала по всему геному в одном эксперименте.

# The Process of Array CGH

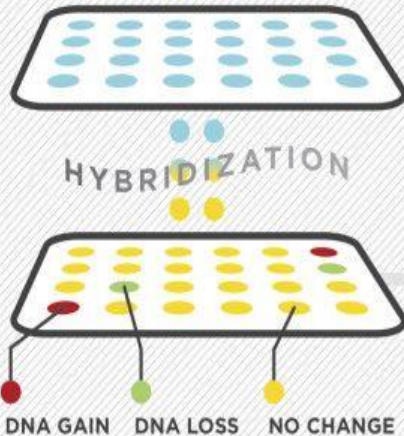
**1**

Patient and control DNA labeled with fluorescent dyes are applied to the microarray.



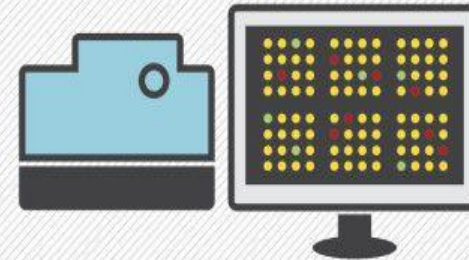
**2**

Patient and control DNA are hybridized to the microarray.



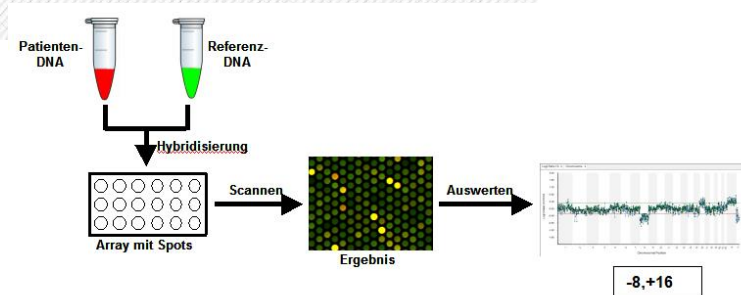
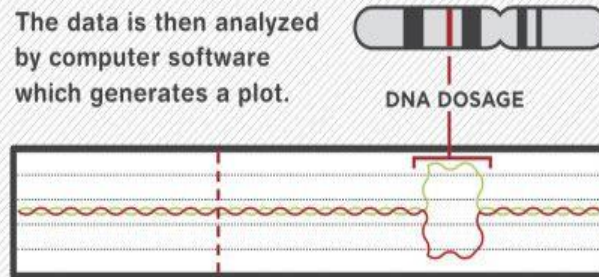
**3**

The fluorescent signals are measured by the microarray scanner.



**4**

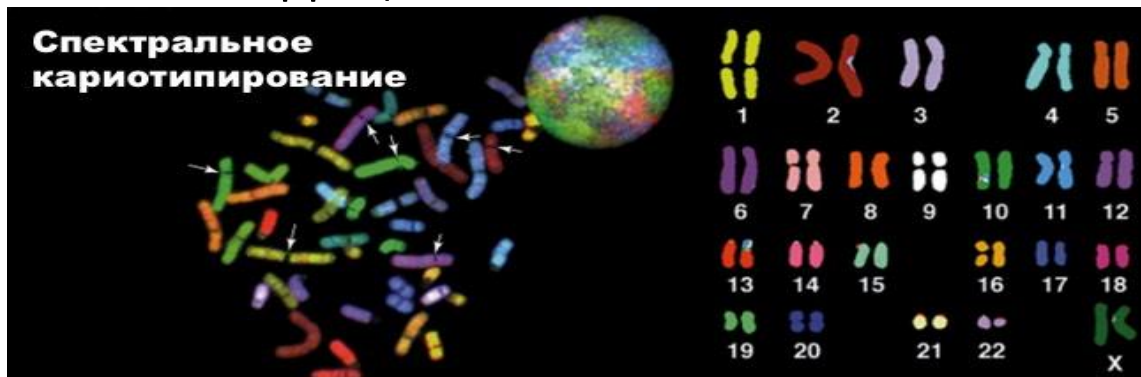
The data is then analyzed by computer software which generates a plot.

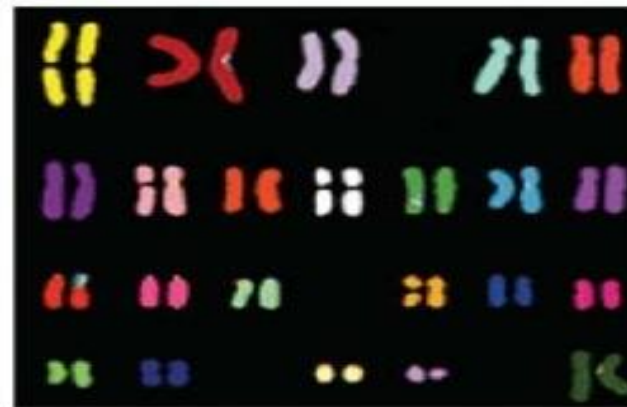
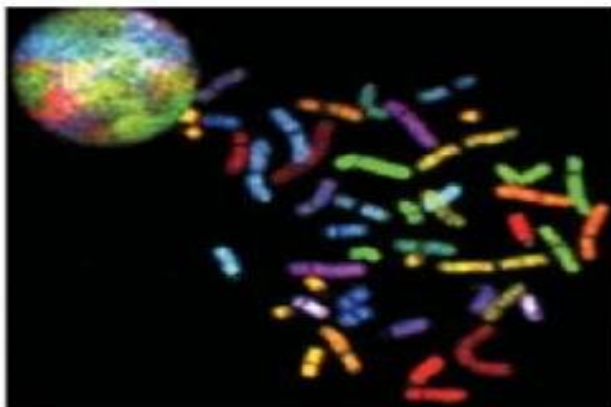
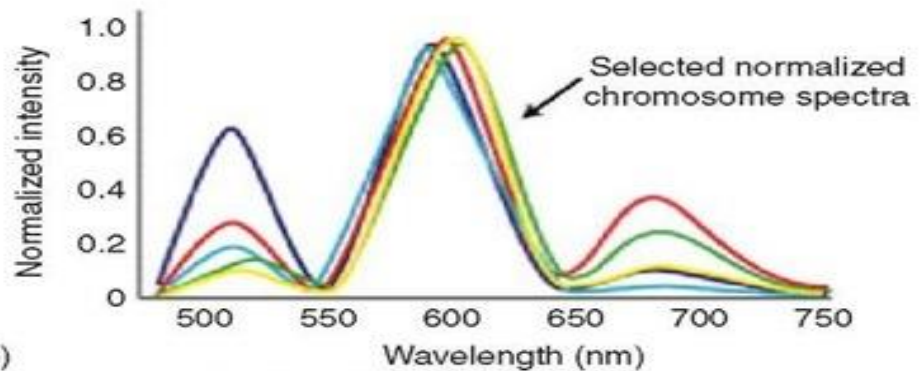
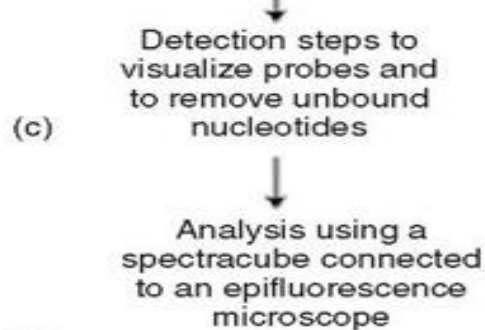
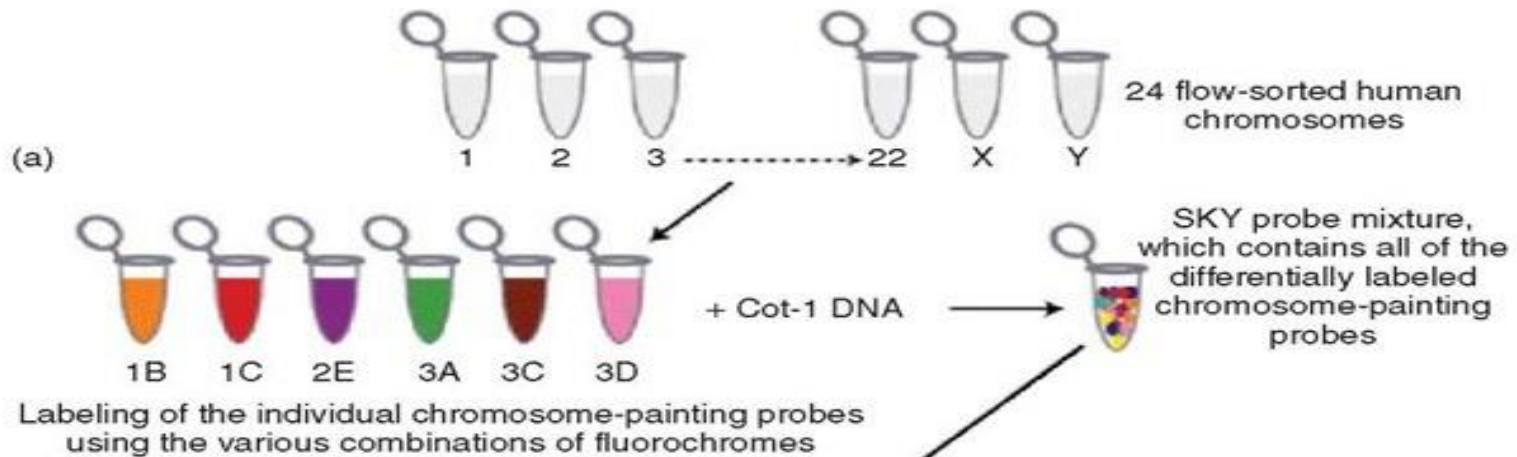




## ***SKY - спектроскопический анализ хромосом.***

- Метод основан на использовании набора зондов и флуоресцентных красителей, имеющих сродство к определенным участкам хромосом.
- Каждая пара хромосом, таким образом, имеет уникальные спектральные характеристики. Используя интерферометр, аналог аппарата для измерения спектра астрономических объектов, можно определить незначительные вариации в спектральном составе хромосом, неразличимые человеческим глазом.
- Данные подвергаются компьютерной обработке по специальной программе, в результате чего каждая пара хромосом приобретает определенный цвет.
- Преимущество метода состоит в более точной идентификации гомологичных хромосом, которые имеют один и тот же цвет, и возможности выявления некоторых транслокаций, которые другими цитогенетическими методами не определяются.
- Метод используется в онкоцитогенетике для выявления в кариотипе опухолевых клеток даже очень незначительных по величине хромосомных aberrаций.





## Другие методы:

1. Культивирование клеток в присутствии кластогенных веществ для исследования разрывов и реагрегации хромосом.
2. Культивирование в среде с недостатком фолиевой кислоты для выявления участков ломкости хромосом.
3. Культивирование фибробластов кожи или клеток других органов для выявления аномалий половых хромосом.

# Показания для проведения цитогенетических исследований

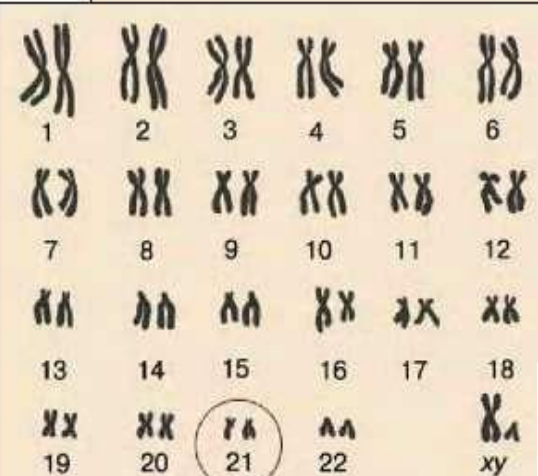
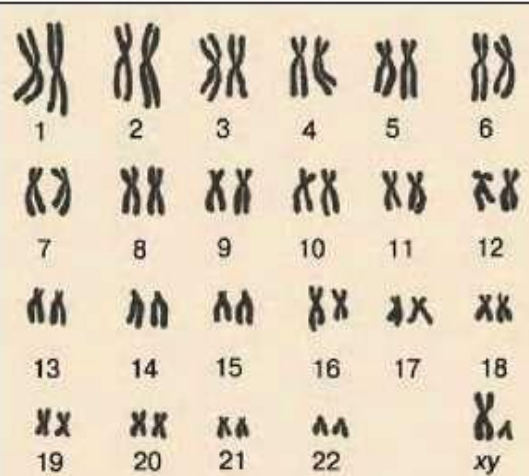
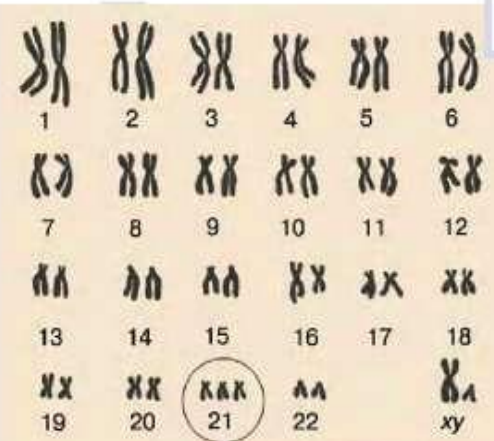
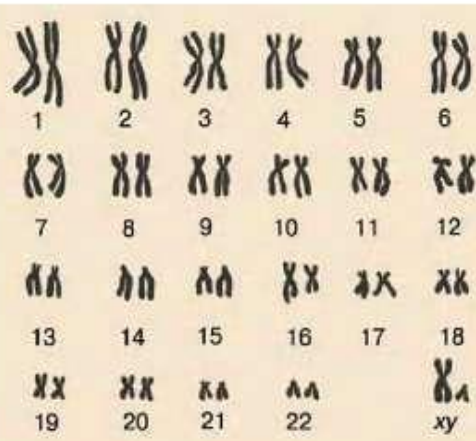
1. Подозрение на хромосомную болезнь по клинической симптоматике (для подтверждения диагноза).
2. Наличие у ребенка множественных врожденных пороков развития, не относящихся к генному синдрому.
3. Многократные (более двух) спонтанные аборты, мертворождения или рождения детей с врожденными пороками развития.
4. Нарушение репродуктивной функции неясного генеза у женщин и мужчин (первичная аменорея, бесплодный брак и др.).
5. Существенная задержка умственного и физического развития у ребенка.



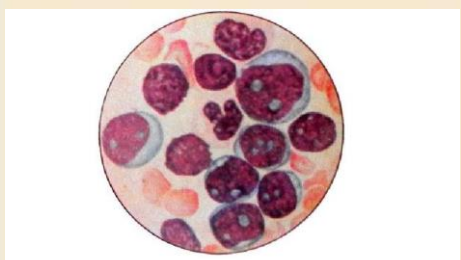
6. Пренатальная диагностика (по возрасту, в связи с наличием транслокации у родителей, при рождении предыдущего ребенка с хромосомной болезнью).
7. Подозрение на синдромы с хромосомной нестабильностью (учет хромосомных aberrаций и сестринских хроматид).
8. Лейкозы (для дифференциальной диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза).
9. Оценка мутагенных воздействий (радиационных, химических).

Медицинских ограничений для применения цитогенетических методов нет. Однако необходимо помнить, что эти методы трудоемкие, дорогие. Правильнее назначать цитогенетическое исследование по рекомендации врача-генетика после проведения медико-генетического консультирования.

# Аномалии, причины которых выявлены с помощью цитогенетического метода:



**Синдром Дауна**



**Лейкозы**

**Лейкоз**



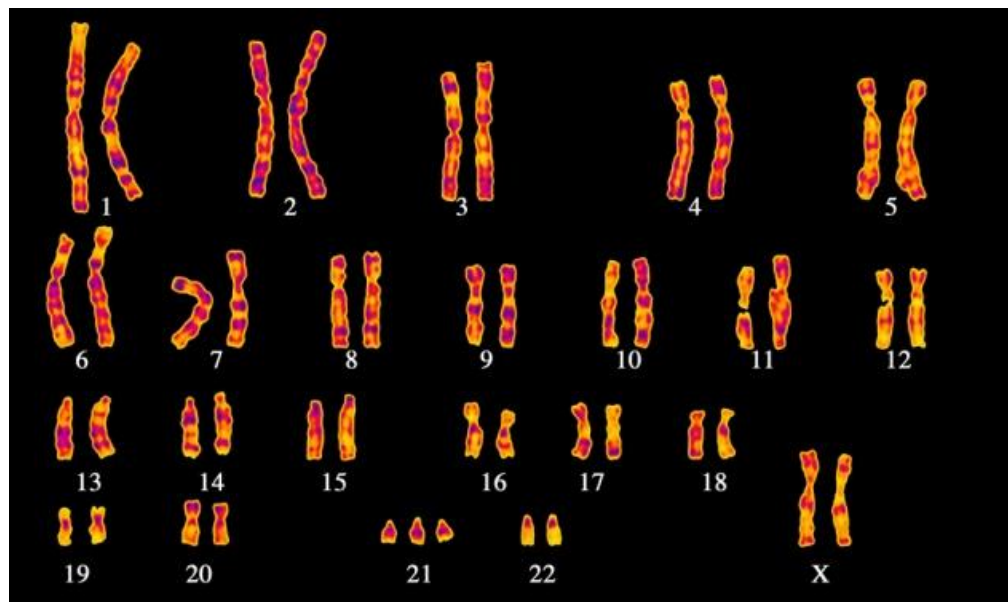
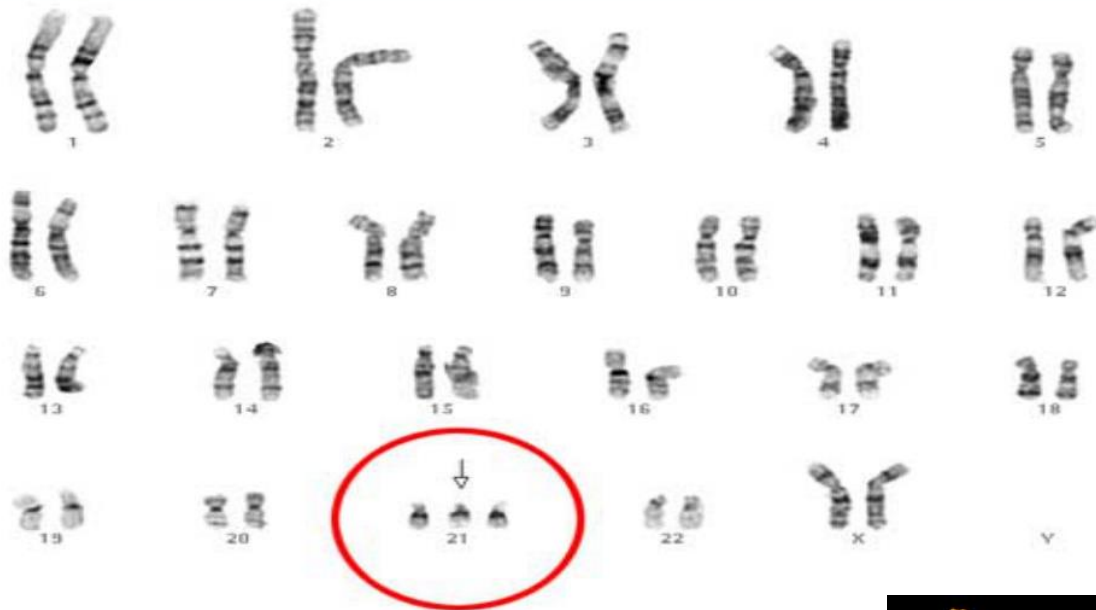
- "плоское лицо";
- эпикантус;



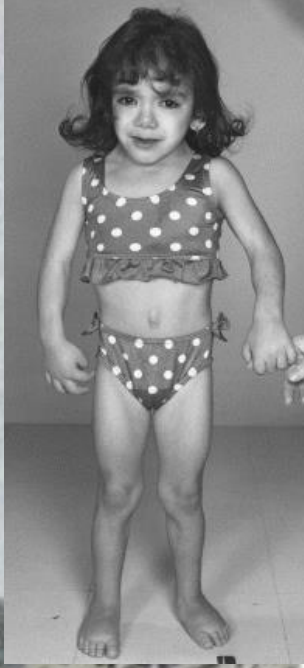
- одна ладонная складка;
- искривление мизинца

аномальное расстояние между первым и вторым пальцами

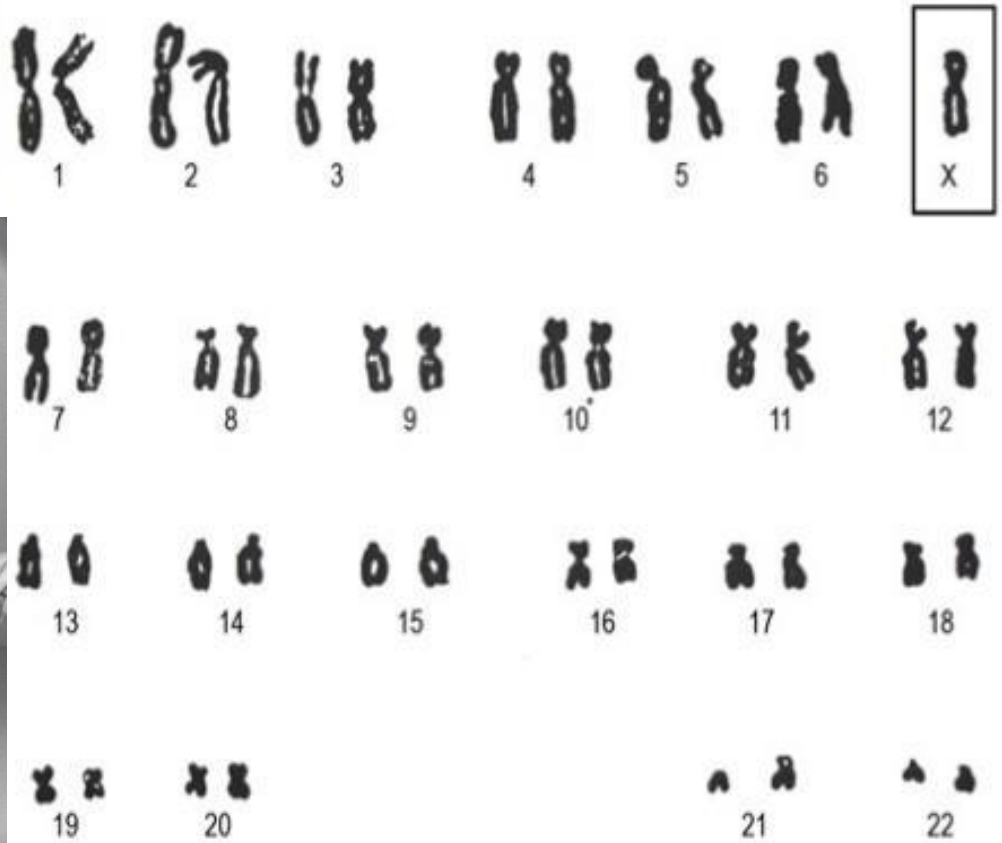
# Хромосомный набор больного синдромом Дауна



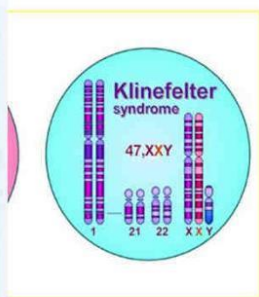
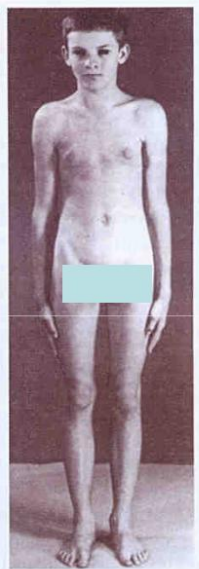
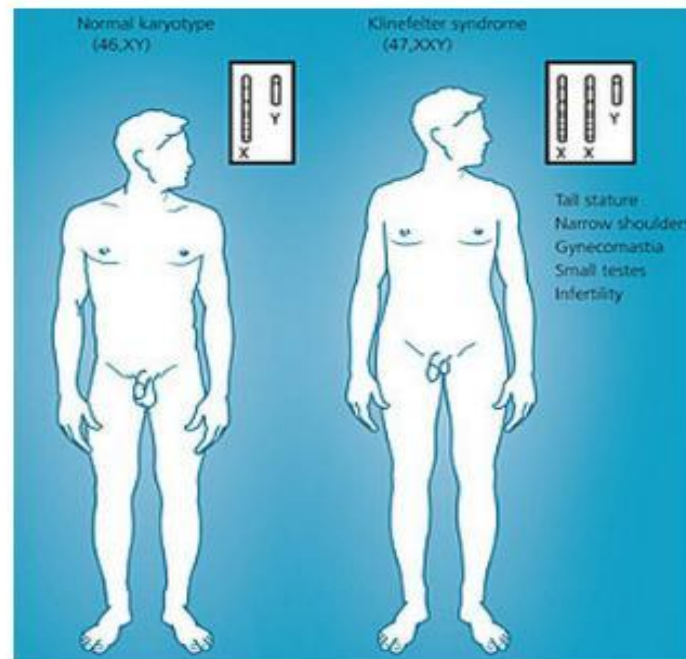
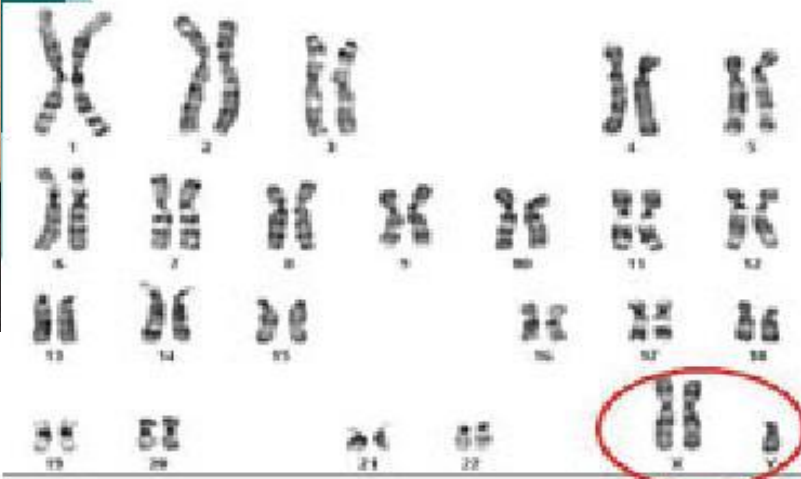




## Синдром Шерешевского-Тернера, 45 / X0

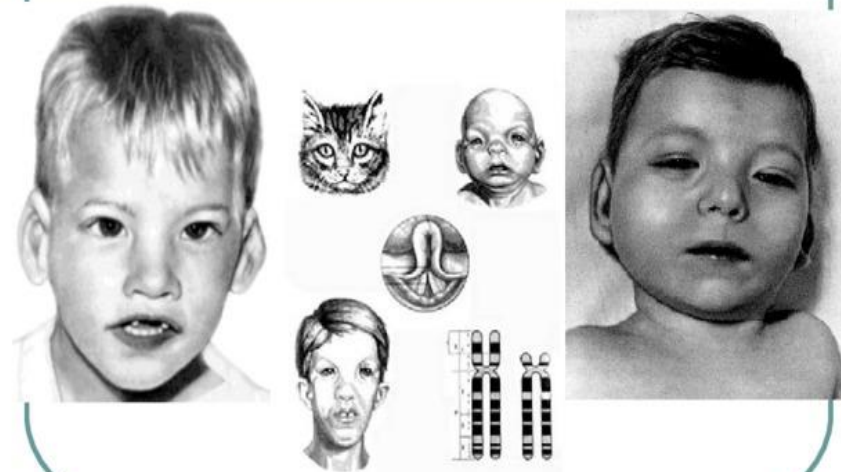


# СИНДРОМ КЛАЙНФЕЛЬТЕРА.



## Синдром кошачьего крика (5p-) (Синдром Лежена)

- обусловлен делецией короткого плеча 5-й хромосомы
- Формула кариограммы:  
46,XX,del(5p-)
- Популяционная частота синдрома -  
примерно 1:45 000



Продолжительность жизни у больных с этим синдромом значительно снижена, только около 14% из них переживают возраст 10 лет

