**Тема 2: Цитологические методы в медико-генетической консультации.**

 Методы выявления хромосомной патологии, нарушения кариотипа – числа и структуры хромосом. Случаи бесплодия или невынашивания беременности, нестабильность генома, специальное лечение. Кариотипирование. Cпектральное кариотипирование. Метод FISH-гибридизации.

**Основные вопросы для изучения:**

1. Кариотипирование.
2. Cпектральное кариотипирование.
3. Метод FISH-гибридизации.

**Целевая установка:** знать методы выявления хромосомной патологии, нарушения кариотипа – числа и структуры хромосом; уметь правильно выбирать метод обследования в различных клинических случаях.

**Формируемые понятия:** цитогенетические исследования, кариотипирование, кариология, спектральное кариотипирование, FISH-гибридизация, хромосомные аномалии, невынашивание беременности, показания для кариотипирования.

**Медицинские аспекты.**

Использование методов выявления хромосомной патологии в практической медицине для установления характера наследования, расчета рисков рождения детей с заболеваниями.

**Оснащение занятия:** компьютер, проектор.

**Некоторые аспекты темы:**

Цитогенетические исследования — совокупность методов исследования связи между явлением наследственности и строением клеток (особенно структур клеточного ядра). Цитогенетические исследования играют важную роль в медико-биологических работах, так как с их помощью выясняют генетические особенности, изменчивость (см.), происхождение и эволюцию живых существ.Объектом цитогенетических исследований служат в первую очередь хромосомы (см.) человека, животных и растений, имеющие специфические для каждого вида свойства (количество, размеры, особенности строения) и образующие характерный для данного организма кариотип. Поэтому методы цитогенетических исследований используются при построении естественных классификаций живых организмов.С помощью цитогенетических исследований обнаруживают изменения в хромосомах, передающиеся потомству и определенным образом влияющие на признаки организма. Изучают вредные хромосомные перестройки, утрату, выпадение или добавление отдельных хромосом или участков хромосом. Они позволяют выявить участие наследственного фактора в возникновении ряда заболеваний человека, в том числе нарушений развития, предрасположенность к злокачественным новообразованиям и т. д. Цитогенетические исследования привели к правильному пониманию природы лучевой болезни.Хромосомы представляют собой плотно упакованные нити ДНК. Количество и структура хромосом строго специфична для каждого вида. У человека в ядрах соматических (не половых) клеток содержится в норме 46 хромосом (23 пары). Одна из пар — половые хромосомы — определяет пол человека. У женщины имеется 2 X хромосомы, такой кариотип обозначается как 46XX, у мужчины есть одна X и одна Y хромосома (кариотип 46XY). Неполовые хромосомы называются аутосомами.Хромосомы в обычном состоянии клетки в ядре не видны, они становятся видны под микроскопом только на определенных фазах деления клеток. Для изучения кариотипа используются клетки в метафазе митоза.Стандартное цитогенетическое исследование – кариотипирование – проводится с целью выявления нарушений числа и структуры хромосом.Для анализа кариотипа клетки крови помещаются в питательную среду и культивируются трое суток. После этого проводятся этапы фиксации, приготовления препаратов, окрашивание и изучение под микроскопом. Стандартный цитогенетический анализ включает специальное окрашивание хромосом G-бэндинг (GTG).

Показаниями для кариотипирования с использованием клеток крови являются бесплодие, невынашивание беременности, подозрение на хромосомную патологию у ребенка или взрослого, задержка полового развития, отсутствие менструаций, пороки развития. Кариотипирование проводится для доноров яйцеклеток и сперматозоидов, а также рекомендовано всем супружеским парам при планировании беременности.В случае замершей беременности рекомендуется проведение кариотипирования абортивного материала. Хромосомные аномалии у эмбриона и плода могут являться причиной неразвивающейся беременности. В связи со сложностью проведения цитогенетического исследования абортивного материала, существует вероятность того, что результат не будет получен в ходе исследования. Такая вероятность составляет около 20%. Причинами невозможности получения результата могут быть плохой рост клеток в культуре (например, из-за длительного периода между остановкой развития плода и проведением медицинского аборта), контаминация культуры бактериями, грибами во время проведения медицинского аборта, контаминация культуры клетками матери.

а) 46,XY Нормальный мужской кариотип;

 б) 46,XX Нормальный женский кариотип;

 в) 45,XY,der(14;15)(q10;q10) Робертсоновская транслокация между хромосомами 14 и15;

 г) 47,XXY Синдром Клайнфелтера

Для проведения исследования у пациента берут кровь и выделяют из нее лимфоциты. Используются специальные вещества (митогены), которые заставляют лимфоциты делиться независимо от их специфичности. Через несколько дней деления культура обрабатывается специальным веществом, которое останавливает процесс деления клеток именно на той стадии, когда видны хромосомы. Из клеток культуры готовятся специальные мазки на стеклах, которые будут использованы для исследования. Для получения дополнительной информации о структуре хромосом используется специальная окраска (G-бэндинг) в результате которой каждая хромосома приобретает специфическую поперечную исчерченность. Каждая такая полоска называется G-блоком. Теперь хромосомы полностью готовы для анализа.Первая стадия анализа называется кариологией. Специалист генетик анализирует под микроскопом 12-15 клеток на предмет выявления количественных и структурных аберраций. К количественным аберрациям относятся изменения числа хромосом. Например, при синдроме Дауна имеется лишняя 21-я хромосома. Структурные аберрации представляют собой изменение самих хромосом (инверсия — поворот участка хромосомы на 180., делеция — выпадение участка хромосомы, транслокация — перенос части одной хромосомы на другую хромосому, и т. д.). Аберрации могут носить регулярный и нерегулярный характер. Регулярные аберрации обнаруживаются в большом проценте клеток или во всех клетках. Они возникают в момент зачатия или в первые дни после зачатия. Нерегулярные мутации чаще всего являются свидетельством дейстия на организм неблагоприятных факторов (радиация, химические вредности и пр.).Спектральное кариотипирование (SKY) и флуоресцентная гибридизация (FISH) являются дополнительными методами цитогенетических исследований. На такие исследования обычно направляет врач-генетик в случаях, когда необходимо дополнительное цитогенетическое обследование.

**Cпектральное кариотипирование** (Spectral Karyotyping – SKY) – новый, высокоэффективный метод цитогенетического исследования, позволяющий быстро и наглядно идентифицировать хромосомные нарушения в случаях, когда сложно установить происхождение хромосомного материала методами стандартного кариотипирования. Метод основан на 24-цветном флуоресцентном окрашивании целых хромосом. Хромосомные перестройки и маркерные хромосомы идентифицируются с помощью SKY по цвету.SKY является инструментом клинического хромосомного анализа транслокаций, маркерных хромосом, сложных межхромосомных перестроек. SKY выявляет также численные хромосомные нарушения. Точная диагностика хромосомного дефекта дает возможность разработать подход для преимплантационной диагностики в случаях сложных нарушений в кариотипе родителей.

**FISH** (флуоресцентная гибридизация) является современным эффективным методом исследования численных хромосомных нарушений, а также сложных случаев нарушений в кариотипе. В основе метода лежит специфическое связывание флуоресцентных меток с определёнными участками хромосом. Анализ может проводиться на клетках крови без культивирования и позволяет анализировать большее число клеток, чем при стандартном кариотипировании. Материалом для FISH-исследования являются не только клетки крови, но и другие клетки (например, сперматозоиды, клетки плода, эмбриона).

**Вопросы, подлежащие проверке при промежуточной и экзаменационной аттестации:**

1. Кариотипирование.
2. Cпектральное кариотипирование.
3. Метод FISH-гибридизации.

**Обязательная литература:**

1. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Изд.2-ое, Новосибирск, 2003.
2. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. Медпрактика-М, 2006, 300 с.
3. Смирнов В.Г. Цитогенетика. Высшая школа-М, 1991, 247 с.
4. Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. Новосибирск, Изд-во Сибирского отделения РАН, 2009.

**Дополнительная литература:**

1. Бочков Н. П. Клиническая генетика. — М.: Медицина, 1997.
2. Тоцкий В. М. Генетика. — Одесса: Астропринт, 2002.
3. Шевченко В. А. Генетика человека. — М. : ВЛАДОС, 2002.
4. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию: учебник для вузов / Ю.С. Ченцов. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 495 с.