**Тема 5: Методы окраски хромосом. Микрофотосъемка.**

Способы подготовки клеток к исследованию. Фиксаторы, их функции, состав. Приготовление реактивов: Гимза. Простая окраска хромосом: используемые красители и цели окрашивания. Методы дифференциальной окраски хромосом: C-, G-, R-окрашивание.

**Основные вопросы для изучения:**

1. Общее строение, типы и форма митотических хромосом. Дифференцировка хромосом по длине: центромера, вторичная перетяжка.
2. Уровни организации хромосом.
3. Эухроматиновые и гетерохроматиновые районы хромосом.
4. Понятие о кариотипе, идиограмме.
5. Методы окраски хромосом: простая окраска: используемые красители и цели окрашивания, дифференциальная окраска: C-, G-, R-окрашивание Микрофотосъемка.

**Целевая установка:**

Изучить хромосомный набор (кариотип) человека с использованием лейкоцитов периферической крови; оввладеть методикой приготовления препаратов хромосомных наборов различных видов.

**Формируемые понятия:**

Хромосомы, аутосомы, дифференцировка хромосом, центромера, вторичная перетяжка, спутник, хроматида, хромонема, нуклеосома, эухроматин, гетерохромат, кариотип, идиограмма, простая окраска хромосом, дифференциальная окраска: C-, G-, R, микрофотосъемка.

**Медицинские аспекты.**

Использование методов кариотипирования в практической медицине для выявления и анализа хромосомной патологии.

**Оснащение занятия:**

Световые и люминесцентные микроскопы с насадкой для фотосъемки, цифровая фотокамера, установленная на тубус светового микроскопа, компьютеры, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовки, кристаллизатор с мостиком для предметных стекол, 2 стакана для промывания препаратов, пинцет для взятия предметных стекол, фильтровальная бумага, иммерсионное масло, ветошь для обработки микроскопа, дистиллированная вода, этиловый спирт (96%), колхицин (колцемид), ледяная уксусная кислота, краситель Романовского-Гимза (азур-эозин), готовая сухая питательная среда для культивирования лимфоцитов крови человека, венозная кровь.

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

1. Общее строение, типы и форма митотических хромосом. Дифференцировка хромосом по длине: центромера, вторичная перетяжка.
2. Уровни организации хромосом.
3. Эухроматиновые и гетерохроматиновые районы хромосом.
4. Методы окраски хромосом: простая окраска: используемые красители и цели окрашивания, дифференциальная окраска: C-, G-, R-окрашивание Микрофотосъемка.

**Некоторые аспекты темы.**

В зависимости от степени пролиферативной активности клеток разных тканей *in vivo* и *in vitro* различают **прямые** и **непрямые** мето­ды получения препаратов хромосом.

Прямые методы используются при исследовании тканей, обла­дающих высокой митотической активностью (костный мозг, хори­он и плацента, клетки лимфатических узлов, ткани эмбриона на ранней стадии развития). Препараты хромосом готовятся непос­редственно из свежеполученного материала после специальной обработки.

Непрямые методы включают получение препаратов хромосом из любой ткани после ее предварительного культивирования в те­чение различного периода времени.

Существует множество модификаций прямого и непрямого мето­дов приготовления хромосомных препаратов, однако основные эта­пы получения метафазных пластинок остаются неизменными:

1. Использование колхицина (колцемида) - ингибитора образова­ния митотического веретена, который останавливает деление кле­ток на стадии метафазы.
2. Гипотонический шок с использованием растворов солей калия или натрия, которые вследствие разницы осмотического давления внутри и снаружи клеток вызывают их набухание и разрыв меж­хромосомных связей. Такая процедура приводит к отделению хро­мосом друг от друга, способствуя более сильному их разбросу в метафазных пластинках.
3. Раскапывание суспензии клеток на предметные стекла.
4. Фиксация клеток с использованием ледяной уксусной кислоты и этанола (метанола) в соотношении 3:1 (фиксатор Карнуа), что способствует сохранению структуры хромосом.
5. Окрашивание хромосомных препаратов.

**Международная система цитогенетической номенклатуры хромосом человека и этапы ее развития**

 В 1960 году в американском городе Денвере была создана пер­вая Международная система цитогенетической номенклатуры хро­мосом человека (An International System for Human Cytogenetic Nomen­clature - ISCN), обеспечившая международную стандартизацию ис­следований хромосом еще на начальных этапах становления цито-генетики человека. Хромосомный набор или кариотип человека вклю­чает 46 хромосом - 22 пары аутосом и 1 пару половых хромосом (XX у лиц женского пола и XY - мужского). В основу Денверской клас­сификации хромосом была положена их морфологическая характе­ристика: размер, форма и положение первичной перетяжки - цент­ромеры. Согласно данной номенклатуре хромосомы нумеруются от 1 до 23 по мере убывания их длины: с 1 по 22 - аутосомы, а 23 пара половые хромосомы. Самые крупные хромосомы человека, имею­щие первые номера, в среднем 5 раз длиннее самых мелких - 21 и 22 хромосом. В соответствии с положением центромеры хромосомы принято делить на 3 группы: **метацентрические** (центромера распо­ложена в середине хромосомы), **субметацентрические** (центроме­ра смещена от центра хромосомы) и **акроцентрические** (центроме­ра расположена в дистальной части хромосомы).

Все аутосомы согласно Денверской классификации были подраз­делены на **7 групп** - от А до G. Группа А (хромосомы 1-3) - большие метацентрические хромосомы. Группа В (хромосомы 4 и 5) - вклю­чает большие субметацентрические хромосомы. Группа С (хромосо­мы 6-12) - среднего размера субметацентрические хромосомы. Груп­па D (хромосомы 13-15) - большие акроцентрические хромосомы. Группа Е (хромосомы 16-18) - включает короткие субметацентрические хромосомы. Группа F - (хромосомы 19 и 20) - маленькие ме-тацентрические хромосомы. Группа G - (хромосомы 21 и 22) - вклю­чает малые акроцентрические хромосомы. Половая Х-хромосома по длине и центромерному индексу (соотношению между длиной корот­кого и длинного плечей хромосомы) близка к хромосомам группы С, а Y-хромосома по величине и морфологии (при обычной окраске) близка к хромосомам группы G.

В дальнейшем номенклатура хромосом человека получила раз­витие на последующих международных цитогенетических конферен­циях в Лондоне (1963 г.) и Чикаго (1966 г.). Однако большой прогресс, достигнутый благодаря внедрению методов дифференциальной ок­раски, потребовал существенного дополнения данной номенклату­ры новыми принципами анализа сегментированных хромосом. В1971 году в Париже на IV международном конгрессе по генетике человека была согласована единая система идентификации хромосом чело­века, учитывавшая дифференцировку хромосом по длине.

Каждая хромосома набора человека при дифференциальной ок­раске характеризуется уникальным для нее сочетанием темно окра­шенных сегментов или полос (англ. - band), чередующихся с нео­крашенными участками или светлыми сегментами. Именно такое спе­цифическое для данной хромосомы сочетание сегментов позволяет четко ее идентифицировать и отличить от других хромосом набора. В пределах короткого (р) и длинного (q) плеча каждой хромосомы выделяют ряд четко идентифицируемых областей или регионов (англ. - region), которые нумеруются арабскими цифрами начиная от центромеры (сеп) к теломерному (tel) участку или **терминаль­ному** (ter) концу хромосомы. Каждая область хромосомы включает определенное число сегментов, нумерация которых (второй арабс­кой цифрой) также идет в направлении от центромерного к теломер­ному участку. Таким образом, обозначение хромосомного сегмента 2q34 означает хромосому №2, длинное плечо, 3 регион и 4 сегмент. Сама центромера обозначается сочетанием цифр 1 и 0, т.е. часть центромеры в пределах короткого плеча обозначается как- р10, а часть, включающая длинное плечо -q10.

Открытие в середине 70-х годов того факта, что профазные и про-метафазные хромосомы позволяют достичь большего числа сегмен­тов, чем метафазные хромосомы, и, следовательно, повысить раз­решающие возможности цитогенетического исследования, привело к разработке методов получения **хромосом** высокого разрешения и потребовало дополнения цитогенетической номенклатуры новыми принципами анализа таких хромосом. В1980 году по этому поводу в Париже было достигнуто международное соглашение, которое было опубликовано в 1981 году под названием "Международная система цитогенетической номенклатуры хромосом человека - сегментация хромосом высокого разрешения" или ISCN (1981). Так, если сегмент в пределах какой-либо хромосомы подразделяется на отдельные суб­сегменты, то после номера сегмента ставится точка, после которой указывается номер субсегмента. Например, если оригинальный сег­мент 1 р31 подразделяется на 3 разных субсегмента, то они обозна­чаются как 1р31.1, 1р31.2и 1р31.3, причем субсегмент 1р31.1 явля­ется проксимальным, а 1 р31.3 - дистальным по отношению к цент­ромере. Дополнительное деление субсегментов на другие сегмен­ты, например субсегмента 1 р31.1, соответственно обозначается как 1p31.11,1р31.12 ит.д.

В1985 году была опубликована цитогенетическая номенклатура, учитывающая новую терминологию для характеристики приобретен­ных конституциональных хромосомных нарушений, выявляемых в опухолевых клетках- ISCN (1985). В 1991 году Международным ко­митетом по стандартизации цитогенетических исследований было опубликовано скорректированное "Руководство по цитогенетике рака" - ISCN (1991). Однако прогресс, достигнутый в дальнейшем благо­даря использованию нового метода молекулярной цитогенетики -флюоресцентной гибридизации in situ (FISH), потребовал дополне­ния цитогенетической номенклатуры новыми принципами молекуляр-но-цитогенетического анализа хромосомных нарушений. Такой до­кумент по стандартизации цитогенетических исследований, отража­ющий последние достижения в этой области, был опубликован в 1995 году-ISCN (1995).

**Дифференциальная окраска хромосом**

В зависимости от целей цитогенетического исследования исполь­зуются различные методы окрашивания хромосом. Наиболее рас­пространенными из них являются рутинная или обычная окраска и ряд методов **дифференциального окрашивания** хромосом: Q-, G-, С-, R- и **NOR-** или **Ag-окраска.** В свою очередь, методы диф­ференциального окрашивания делятся на 2 группы: 1) приводящие к образованию сегментов вдоль длины всех хромосом (например Q-, G- или R-сегменты); 2) приводящие к окрашиванию специфических хромосомных структур, в результате чего выявляется ограниченное число сегментов (С-, Т- или NOR-сегменты).

Рутинная окраска хромосом достигается путем простого окра­шивания полученных хромосомных препаратов красителем Романов-ского-Гимза (азур-эозином), без какой-либо их предварительной об­работки. Такая окраска приводит к сплошному прокрашиванию хро­мосом по длине, что не позволяет идентифицировать разные мор­фологически сходные хромосомы набора. Исторически рутинная ок­раска была самой первой используемой в цитогенетике человека окраской, активно применяющейся в течение 1959-1970 гг., до вне­дрения методов дифференциального окрашивания хромосом. В на­стоящее время она практически не применяется для диагностики кон­ституциональных хромосомных нарушений, однако находит приме­нение при анализе хромосомных аберраций в тестировании факто­ров среды на мутагенную активность.

Q-окраска (от англ. Quinacrine - акрихин) выявляется на хромо­сомах в виде чередования ярко- и темно-флюоресцирующих полос с помощью флуоресцентной микроскопии хромосомных препаратов, окрашенных такими флюорохромами (флуоресцентными красителя­ми) как производные акридина - акрихин дигидрохлорид (атебрин) или акрихин-иприт. Эти красители обладают способностью присое­диняться к ДНК путем интеркаляции или с помощью внешних ион­ных сил. Q-окраска имеет свою кодировку (QFQ) по международной цитогенетической номенклатуре. Заслуга применения производных акрихина для получения Q-сегментов на хромосомах человека при­надлежит шведскому цитогенетику Касперссону (1970). В популяци­ях человека существует межиндивидуальная вариабельность отдель­ных участков хромосом, выявляемых с помощью Q-окраски -Q-полиморфизм хромосом. Он выражается в особенно ярко светя­щихся сегментах, локализованных в центромерных участках (сеп) хро­мосом 3 и 4, а также в коротких плечах (р11) и спутниках (р13) всех акроцентрических хромосом человека 13-15,21 и 22. Кроме того, у лиц мужского пола ярко флюоресцирующейся областью является и дистальная часть длинного плеча хромосомы Y - сегмент q12. Этот участок Y-хромосомы обладает выраженным межиндивидуальным полиморфизмом и четко наследуется по мужской линии. Все пере­численные ярко флюоресцирующие участки хромосом являются об­ластями локализации гетерохроматина - некодирующих повторяю­щихся последовательностей ДНК, вариабельность которых не при­водит к каким-либо фенотипическим изменениям. Указанные выше ярко флюоресцирующие Q-полиморфные хромосомные сегменты являются удобными цитогенетическими маркерами и могут быть ис­пользованы как для характеристики популяций, индивидов и клеточ­ных линий, так и для решения некоторых судебно-медицинских про­блем.

G-окраска (от англ. Giemsa- Гимза) выявляется благодаря пред­варительной обработке хромосомных препаратов слабым раствором протеолитического фермента трипсина и последующей окраске кра­сителем Гимза. При этом наблюдается полосатая исчерченность хро­мосом, где темные полосы в некоторой степени соответствуют гете­рохроматиновым районам, а светлые-эухроматиновым. G-окраска имеет свою кодировку (GTG) по международной цитогенетической номенклатуре. Оптимальные условия окраски находят в каждой ла­боратории эмпирическим путем. Методика G-окраски хромосом че­ловека была впервые предложена английской исследовательницей Мариной Сибрайт (Seabright) в 1972 году и практически в неизмен­ном виде используется до настоящего времени. По числу, величине и расположению выявляющихся сегментов рисунок G-окраски ана­логичен рисунку при Q-окраске, где темно окрашенные G-сегменты соответствуют флюоресцирующим Q-сегментам. Различия состоят в том, что: а) несветящиеся гетерохроматиновые центромерные сег­менты в хромосомах 1 и 16 хорошо прокрашиваются красителем Гим­за; б) ярко флюоресцирующие при Q-окраске сегменты 3,4,13-15, 21, 22 и Y-хромосом не выделяются особой интенсивностью при G-окраске. На G-окрашенных метафазных хромосомах выделяется око­ло 320 сегментов на гаплоидный геном.

R-окраска (от англ. Reverse - обратная) отличается противопо­ложностью рисунка G-окраске. Темноокрашенными здесь являются эухроматиновые участки хромосом, а светлыми - гетерохроматино­вые. Существует несколько модификаций метода R-окраски и каж­дый из них имеет свою кодировку по международной цитогенетичес­кой номенклатуре. Наиболее приемлемой является обработка пре­паратов Ва(ОН)2 с прогреванием их при 60°С и последующей отмыв­кой в дистиллированной воде и окрашиванием раствором красителя Гимза. Кодировка R-окраски, полученной таким способом - RHG.

С-окраска (от англ. Constitutive heterochromatin - конститутивный гетерохроматин) выявляется в виде вариабельных по величине тем-ноокрашенных сегментов конститутивного гетерохроматина в прицен-тромерных районах хромосом, в то время как эухроматиновые учас­тки хромосом прокрашиваются очень бледно. Методы получения С- окраски могут варьировать, но важным условием является предва­рительная обработка препаратов щелочью с последующей двухча­совой инкубацией препарата в двукратном стандартном солевом растворе (2 X SSC) при 65°С. В качестве щелочных растворов обыч­но применяют гидрат окиси бария или натрия. Окраску препаратов производят красителем Гимза. С-окраска имеет свою кодировку **(CBG)** по международной цитогенетической номенклатуре. Конститутивный гетерохроматин построен преимущественно из многократно повто­ряющихся последовательностей ДНК, так называемой сателлитной ДНК, выявляемой во время градиентного центрифугирования хро­матина. В популяциях человека, также как и в случае Q-окрашива-ния, существует межиндивидуальная вариабельность по определен­ным участкам хромосом, в данном случае по величине блоков С-ге-терохроматина, выявляемых с помощью С-окраски **(С-полиморфизм** хромосом). По локализации выделяют 4 типа С-хроматина: 1) соб­ственно центромерный, присущий всем хромосомам, с относитель­но небольшими по площади темноокрашенными блоками; 2) более крупные блоки гетерохроматина, располагающиеся в прицентромер-ных районах длинных плечей аутосом 1, 9 и 16, обладающие четко выраженным межиндивидуальным полиморфизмом; 3) большой блок гетерохроматина дистальной части длинного плеча Y-хромосомы, заметно варьирующий по величине у разных лиц мужского пола; 4) гетерохроматин коротких плеч акроцентрических хромосом. Метод выявления центромерного гетерохроматина позволяет прежде все­го оценить хромосомный полиморфизм четырех хромосом набора -1, 9,16 и Y, а также используется в практике клинической цитогене-тики для уточнения характера структурных перестроек затрагиваю­щих данные хромосомы. По международной цитогенетической но­менклатуре увеличенные или уменьшенные блоки гетерохроматина обозначаются как qh+ или qh- (h - гетерохроматин). Например, за­пись кариотипа 46,XX,9qh+ означает, что у нормальной женщины имеется вариант хромосомы 9 с большим гетерохроматиновым бло­ком в длинном плече, а запись 46,XYqh- означает, что у мужчины име­ется уменьшение длины гетерохроматинового блока на длинном пле­че Y-хромосомы.

**NOR-окраска** (от англ. Nucleolar Organizer Region - Ядрышко-Образующие Районы **-ЯОР)** или **Ag-окраска** (серебрение)-приме­няется для выявления ядрышкообразующих районов, расположен­ных в коротких плечах (сегмент q12 - спутничная нить) всех 5 пар акроцентрических хромосом человека (13,14, 15, 21 и 22), с помо щью окрашивания солями серебра. Известно, что районы ядрышко-вых организаторов содержат гены рибосомальной РНК (рРНК). Еди­ница транскрипции генов рРНК содержит гены 5,8S, 18S и 28S РНК. Ряды рРНКтранскрипционных единиц располагаются тандемно вдоль ДНК и отделяются друг от друга нетранскрибируемыми последова­тельностями - спейсерами. Транскрибируемый район и нетранскри-бируемый спейсер тандемно повторяются примерно 40 раз в каждой из 5 пар акроцентрических хромосом, составляя около 400 копий ри-босомных генов на геном. В настоящее время для визуализации этих районов на метафазных хромосомах применяют метод серебрения Хоуэлла и Блэка (Howell, Black, 1980), основанный на использова­нии комбинации 50% раствора нитрата серебра с желатиновым про­явителем окраски в условиях прогревания препаратов при 60°С. С помощью этого метода сами хромосомы окрашиваются в желтый цвет, а в коротких плечах акроцентрических хромосом на спутничных ни­тях четко выделяются черные точечные образования - глыбки вос­становленного металлического серебра. Размеры этих глыбок, отра­жающие активность ЯОР, на разных хромосомах существенно варь­ируют - от отсутствия заметной окраски - до достаточно крупных блоков серебра **(Ag-полиморфизм).** Тонкие механизмы окраски яд­рышкообразующих районов хромосом пока неизвестны, но ясно, что красящим субстратом является не ДНК рибосомных генов и не рРНК, а кислые белки, связанные с ней. Для оценки данного типа хромо­сомного полиморфизма предложена полуколичественная 5-балль­ная система оценки активности ЯОР каждой из 5 пар акроцентри­ческих хромосом генома человека (0 - отсутствие окраски, 1 - сла­бая, 2 - средняя, 3 - сильная и 4 - очень сильная окраска ЯОР хро­мосом, при которой размеры Ag-блока значительно превышают тол­щину хроматид). При сложении баллов отдельных ЯОР может быть оценена активность всех 10 ЯОР генома по критерию суммарной функциональной активности ЯОР, предложенному Н.А. Ляпуновой с соавт. (1988). В популяциях человека существует межиндивидуаль­ный полиморфизм Ag-окрашенных хромосом, который выражается в специфичности степени окраски отдельных хромосом у разных ин­дивидов, являющейся наследуемой характеристикой.

Т-окраска (от англ. Telomere -теломера) - применяется для вы­явления теломерных районов хромосом в коротких и длинных пле­чах. Метод включает инкубацию препаратов хромосом при 87°С в течение 20-60 мин в растворе фосфатного буфера при рН 5,1 с пос­ледующей окраской раствором красителя Гимза.

**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.