

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА С ОСНОВАМИ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

**УЧЕБНИК
ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ УЧИЛИЩ И КОЛЛЕДЖЕЙ**

3-е издание, стереотипное

Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ГОУ ВПО «Первый Московский медицинский университет имени И.М. Сеченова» в качестве учебника для студентов учреждений среднего профессионального образования, обучающихся по специальности 31.02.01 «Лечебное дело» по ОП.05 «Генетика человека с основами медицинской генетики»; специальностям 32.02.01 «Акушерское дело», 33.02.01 «Фармация», 34.02.01 «Сестринское дело» по ОП.04 «Генетика человека с основами медицинской генетики»



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2017

ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Цитогенетическое исследование включает следующие основные стадии:

- получение препаратов метафазных хромосом из лимфоцитов периферической крови;
- окрашивание препаратов;
- микроскопический анализ и обработка результатов.

Для получения препаратов хромосом в заранее приготовленные стерильные пробирки с гепарином вносят 5–6 мл крови и закрывают стерильной пробкой. Для постановки культуры обычно используют цельную кровь, можно также использовать плазму, обогащенную лейкоцитами. В соответствующих пособиях и руководствах методы цитогенетических исследований описаны достаточно подробно, отметим лишь общую схему.

Полученную кровь (0,5 мл на 4,5 мл культуральной смеси) культивируют в термостате при температуре 37 °С. Культуральная смесь состоит из питательной среды (типа RPMI-1640, Игла или 199) с добавлением 15–17% сыворотки (крупного рогатого скота, телячьей или эмбриональной телячьей), 2 мМ глутаминовой

кислоты и антибактериальных препаратов (бензилпенициллин 100 МЕ/мл, стрептомицин 0,1 мкг/мл). В норме лимфоциты практически не делятся, т.е. находятся в стадии G_0 клеточного цикла. Для того чтобы перевести их в стадию G_1 , в культуральную смесь необходимо добавить фитогемагглютинин, стимулирующий процесс деления. Интерфазные хромосомы невозможно наблюдать в обычный световой микроскоп, а вот в митозе при делении благодаря высокой степени компактизации хромосомы становятся видимыми. Для накопления клеток на стадии метафазы митоза используют ингибиторы образования веретена деления — колхицин или колцемид.

По окончании инкубации проводят фиксацию смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1, но перед фиксацией клетки выдерживают в гипотоническом растворе калия хлорида (0,56%); время гипотонической обработки должно составлять 20–25 мин. После нескольких смен фиксатора клеточный осадок приобретает белый цвет. При последней промывке удаляют супернатант, оставляя примерно 0,25–0,5 мл клеточной суспензии.

Одним из условий для получения качественных препаратов хромосом является подготовка предметных стекол. Поверхность стекла должна быть идеально чистой. Клетки тщательно ресуспендируют в оставшемся фиксаторе с помощью пастеровской пипетки, клеточную суспензию наносят на предметное стекло и высушивают его.

Время культивирования зависит от поставленной задачи. Так, при анализе кариотипа оно составляет 72 ч. Это время соответствует наступлению второго митоза, когда число клеток удваивается. При использовании цитогенетического метода для целей биодозиметрии (об этом ниже) необходимо анализировать клетки, проходящие первое деление. В этом случае время культивирования составляет около 50 ч и варьирует в незначительных пределах для каждой лаборатории; кроме того, существуют индивидуальные колебания.

При рутинном (стандартном) окрашивании красителем Романовского–Гимза все хромосомы окрашены равномерно. В этом случае можно определить числовые мутации и такие перестройки, как дисцентрики, парные и одиночные фрагменты, центрические и ацентрические кольца, хроматидные aberrации. Опытный цитогенетик может обнаружить и аномальные хромосомы, возникшие в результате инверсии или симметричной транслокации (рис. 1).



Рис. 1. Рутинное окрашивание хромосом

Для более детального анализа применяют дифференциальные методы окрашивания. Каждая хромосома имеет присущие лишь ей не только длину и соотношение плеч, но и уникальное чередование участков эухроматина и гетерохроматина. Благодаря этому после специальной обработки полосы (бэнды) окрашиваются в разные цвета; окраска хромосомы напоминает штрихкод. Таким образом, становится возможным выявить весь спектр хромосомных aberrаций в пределах разрешения, определяемого шириной полос (рис. 2).



Рис. 2. Дифференциальное окрашивание хромосом (G-banding)

Во время культивирования в культуральную смесь можно добавить избыточное количество бромдезоксигуанидина (БУДР — аналог тимидина). БУДР будет встраиваться во вновь синтезируемые цепи ДНК, и, соответственно, в каждой хромосоме клеток второго митоза в одной из хроматид обе нити двунитевой молекулы ДНК будут содержать только БУДР вместо тимидина, а в другой — только одна из них, а другая, послужившая исходной матрицей, будет содержать тимидин. После окрашивания одна из них приобретет светлую окраску, а другая — темную (так называемые арлекиновые хромосомы). Этот метод позволяет увидеть обмены между сестринскими хроматидами (СХО — сестринские хроматидные обмены).

Хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови можно рассматривать как индикатор мутагенного воздействия. Существуют некоторые особенности. Так, при химическом мутагенезе чаще образуются сестринские хроматидные обмены и aberrации хроматидного типа; для радиационного мутагенеза характерны aberrации хромосомного типа. Важно отметить, что частота хромосомных нарушений существенно повышена у курильщиков.

Существует количественная зависимость между частотой хромосомных aberrаций и дозой облучения; кроме того, кривые доза-эффект, полученные при облучении *in vivo* (данные наблюдений за пациентами, прошедшими курс радиотерапии, за профессионалами, подвергающимися радиационному воздействию в ходе профессиональной деятельности либо вследствие радиационных аварий) и *in vitro* (эксперименты с клеточными культурами) совпадают. Эти два обстоятельства сделали возможным использовать частоту хромосомных aberrаций (дицентриков и колец) для целей биологической дозиметрии. Кровь циркулирует по всему организму, и при облучении любой части тела лимфоциты подвергнутся воздействию. Оказалось возможным заранее в лаборатории получить градуировочную кривую доза-эффект для частоты aberrаций хромосом определенного типа, характерного для радиационного воздействия, а потом использовать ее для количественного определения дозы облучения пострадавших. Важно и то, что автоматически учитываются различия в радиочувствительности клеток людей (рис. 3. Приложение, см. цв. вклейку).

Помимо лимфоцитов для проведения цитогенетического анализа могут использоваться и другие ткани, например, костный мозг, фибробласты кожи; при проведении пренатальной диагностики прово-

дят цитогенетическое исследование хориона, в онкологии объектом исследования служат опухолевые клетки.

В последние годы все более широкое распространение приобретает метод, который можно назвать молекулярно-цитогенетическим. Речь идет о флуоресцентной гибридизации *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*); по первым буквам метод получил название FISH. Метод FISH основан на способности хромосомной ДНК (ДНК-мишень) связываться в определенных условиях с фрагментами меченой ДНК (ДНК-зонд), включающими нуклеотидные последовательности, комплементарные ДНК-мишени.

Предметные стекла с метафазами обрабатывают таким образом, чтобы произошла денатурация (расхождение нитей двойной спирали) ДНК. Затем на стекло наносят в избыточном количестве заранее приготовленные пробы — комплементарные последовательности ДНК, содержащие флуоресцентную метку, которые взаимодействуют с однонитевыми структурами, образуя хроматиды, одна нить которых состоит из меченой ДНК, а другая — «обычная» (исходная). После окрашивания флуоресцентным красителем меченая хромосома отличается по окраске от остальных. Анализ производится с использованием флуоресцентного микроскопа со специальными фильтрами.

Особая практическая значимость FISH-метода связана с возможностью детекции меток не только на метафазных пластинках, но и в интерфазных клетках. Это существенно расширяет границы его применения.

Метки могут быть специфичны и соединяться либо с целыми хромосомами, либо с их фрагментами; существуют специальные метки, соответствующие центромерам. Зонды, используемые в FISH-методе, подразделяют на:

- CEP — *Chromosome Enumerator Probe*, хромосомные нумераторы или центромерные зонды;
- LSI — *Locus Specific Identifier*, локус специфические зонды;
- SubTel — *Subtelomere specific*, субтеломерные зонды;
- WCP — *Whole-Chromosome-Painting*, зонды полного окрашивания хромосом, целно-хромосомный зонд.

Если метки соответствуют целой хромосоме, при цитогенетическом анализе быстро и несложно будет установить наличие этой хромосомы в кариотипе, а также увидеть, участвует ли она в транслокациях или других перестройках, затрагивающих и другие хромосомы. Так, при проведении пренатальной диагностики возможно с большой