

Цитогенетически й и молекулярно- генетический методы

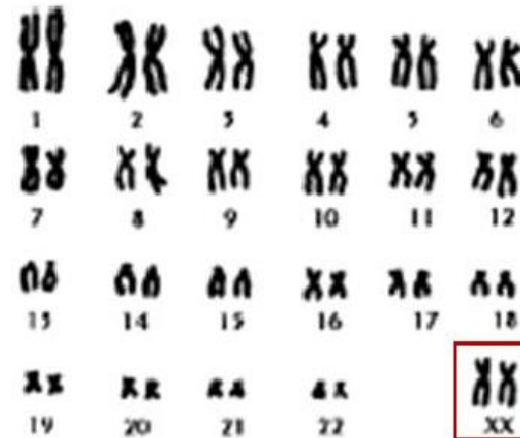
1.1 Цитогенетические методы

С помощью данного метода можно изучать наследственный материал клетки: **совокупность хромосом в целом** (кариотипирование) или наличие и количество **X-хромосом** (определение полового хроматина — число глыбок полового хроматина или телец Барра). Исследование проводится с помощью светового микроскопа (изготовление и изучение микропрепаратов).

Кариотипирование

- **Кариотип** — совокупность признаков (число, размеры, форма и т. д.) полного набора хромосом, присущая клеткам данного биологического вида (*видовой кариотип*), данного организма (*индивидуальный кариотип*) или линии (клона) клеток. Графическое изображение кариотипа, то есть, набора хромосом при расположении их по группам в зависимости от формы и величины, называют — **идиограмма** (кар

Кариотип человека



Определение кариотипа

Для определения кариотипа используются клетки в одной из стадий их деления — **метафазе митоза**.

После фиксации препараты метафазных хромосом **окрашивают и фотографируют**; из микрофотографий формируют так называемый **систематизированный кариотип**.

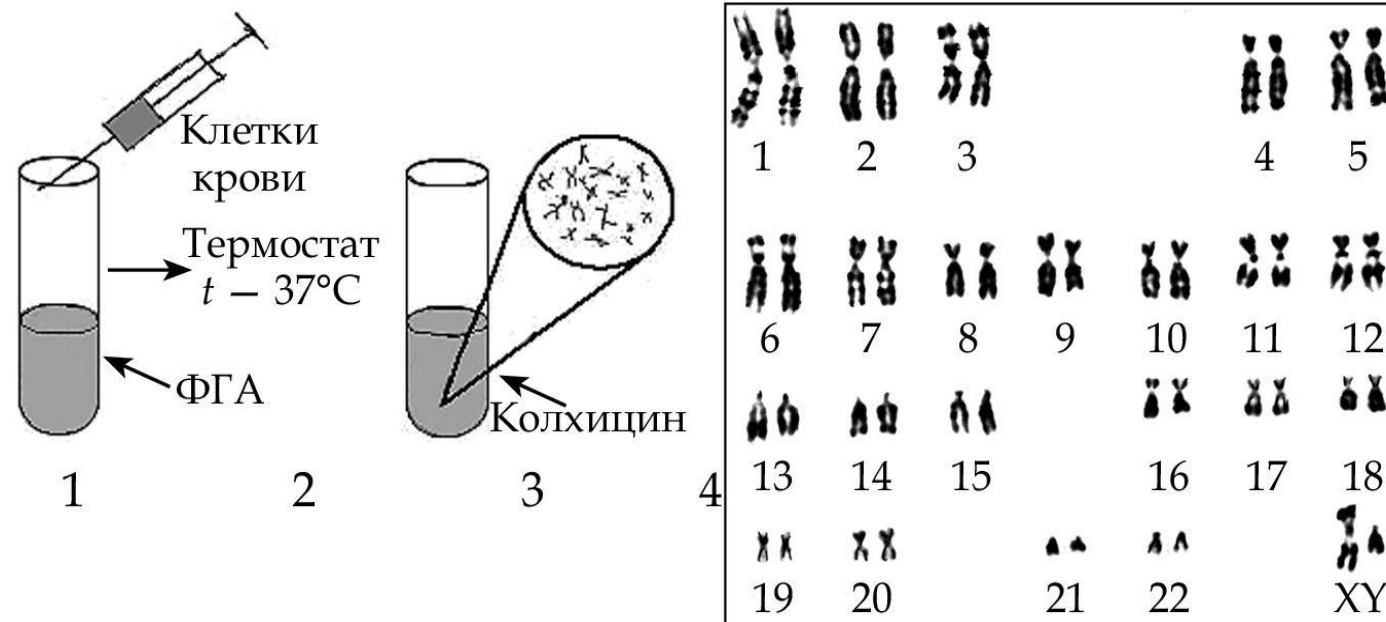


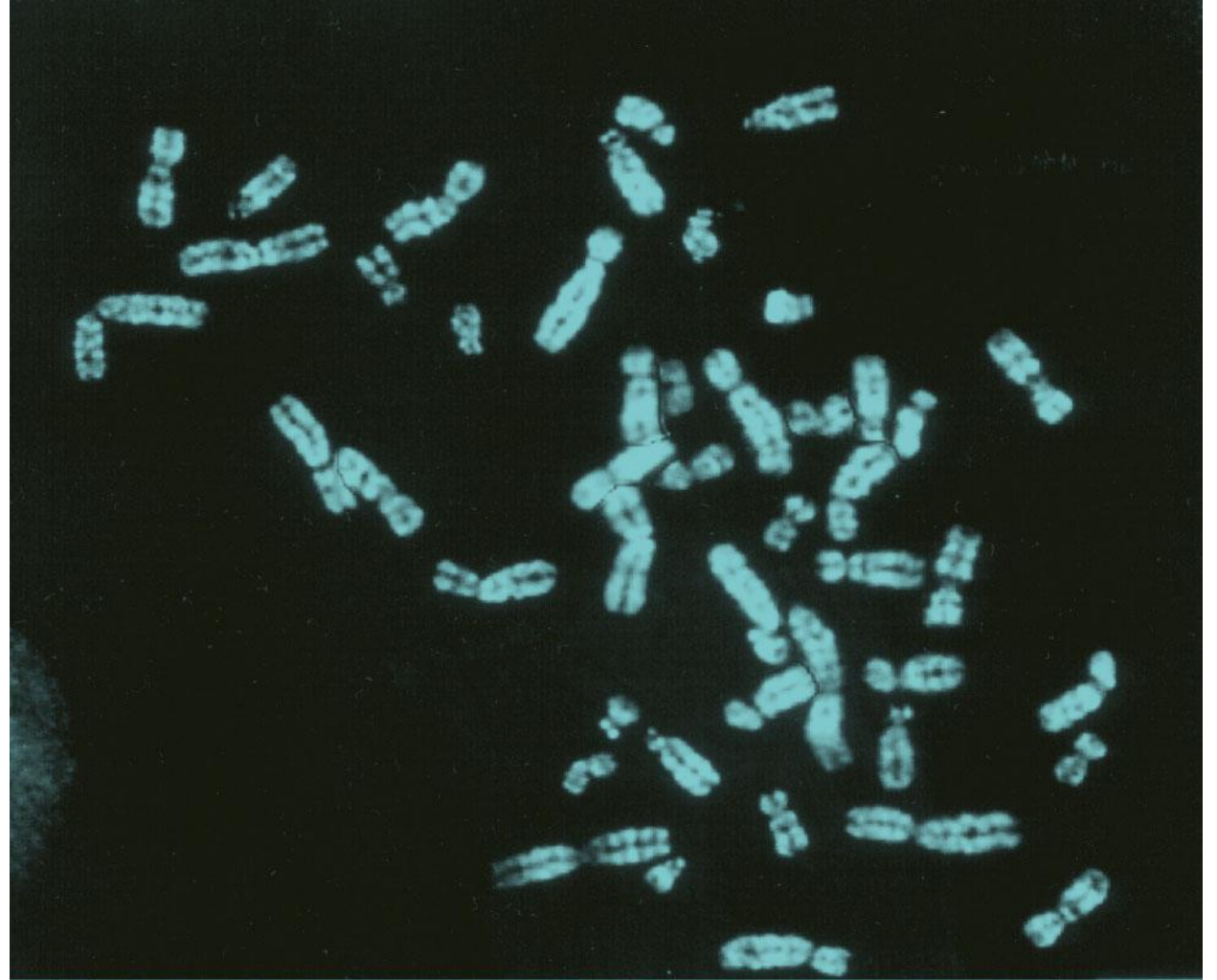
Рис. 56. Последовательность действий для получения кариотипа человека:
1. Помещение лимфоцитов (лейкоцитов) в среду с фитогемагглютинином (ФГА). 2. Культивирование клеток (митотические деления клеток).
3. Остановка митоза на стадии метафазы путем введения в среду колхицина.
4. Обработка гипотоническим раствором, изготовление микропрепаратов, получение микрофотографий метафазных пластинок (кариотипов).
5. Составление индивидуального хромосомного комплекса (кариограммы)

Классический и спектральный кариотипы

- Для получения классического кариотипа используется окраска хромосом различными красителями или их смесями: в силу различий в связывании красителя с различными участками хромосом окрашивание происходит неравномерно и образуется характерная полосчатая структура.
- Первый метод окраски хромосом, позволяющий получить такие высокодетализированные изображения, был разработан шведским цитологом Касперссоном (**Q-окрашивание**).

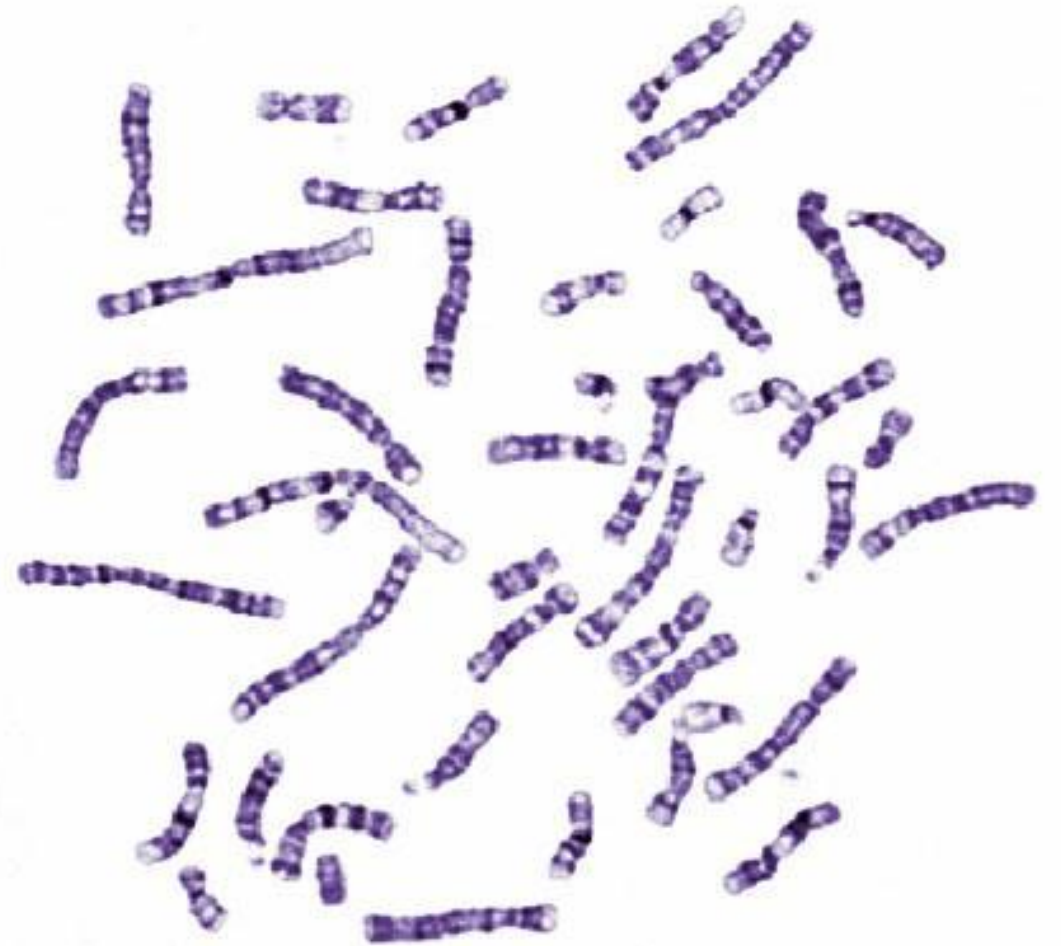
Q-окрашивание

Окрашивание по Касперссону акрихин-ипритом с исследованием под флуоресцентным микроскопом. Хромосомы окрашиваются в виде специфических наборов светлых и темных полос (Q-полосы). Чаще всего применяется для исследования Y



G-окрашивание

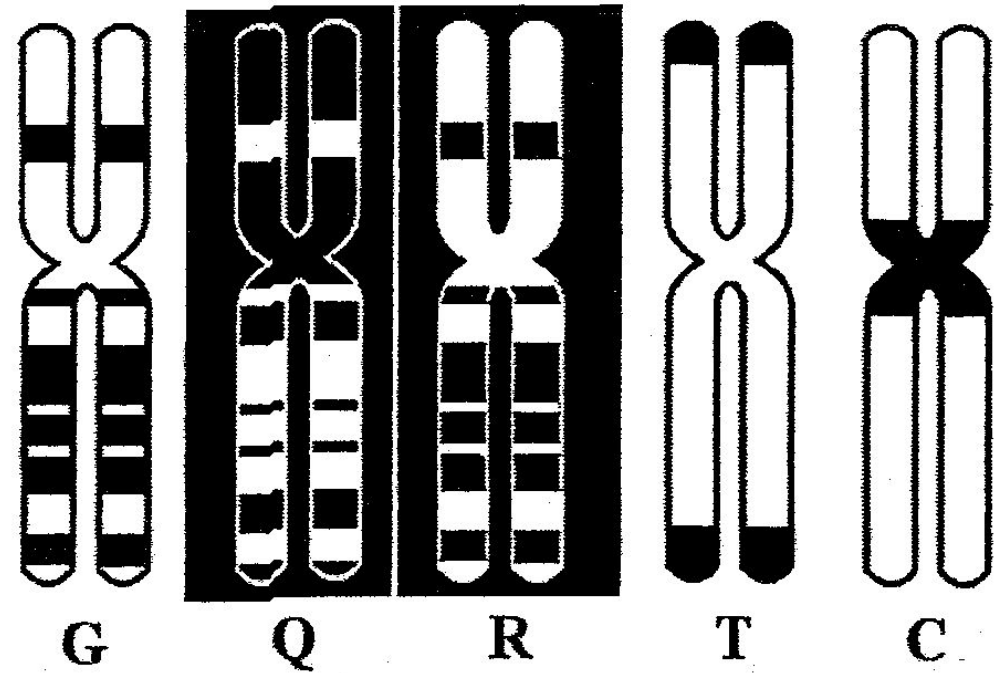
Модифицированное окрашивание по **Романовскому — Гимзе**. Чувствительность выше, чем у Q-окрашивания, поэтому используется как стандартный метод цитогенетического анализа. Применяется при выявлении небольших aberrаций и маркерных хромосом (сегментированных иначе, чем нормальные гомологичные хромосомы).



R-окрашивание

Используется акридиновый **оранжевый** и подобные красители, при этом окрашиваются участки хромосом, нечувствительные к G-окрашиванию.

Используется для выявления деталей гомологичных G- или Q-негативных участков сестринских хроматид или гомологичных хромосом.

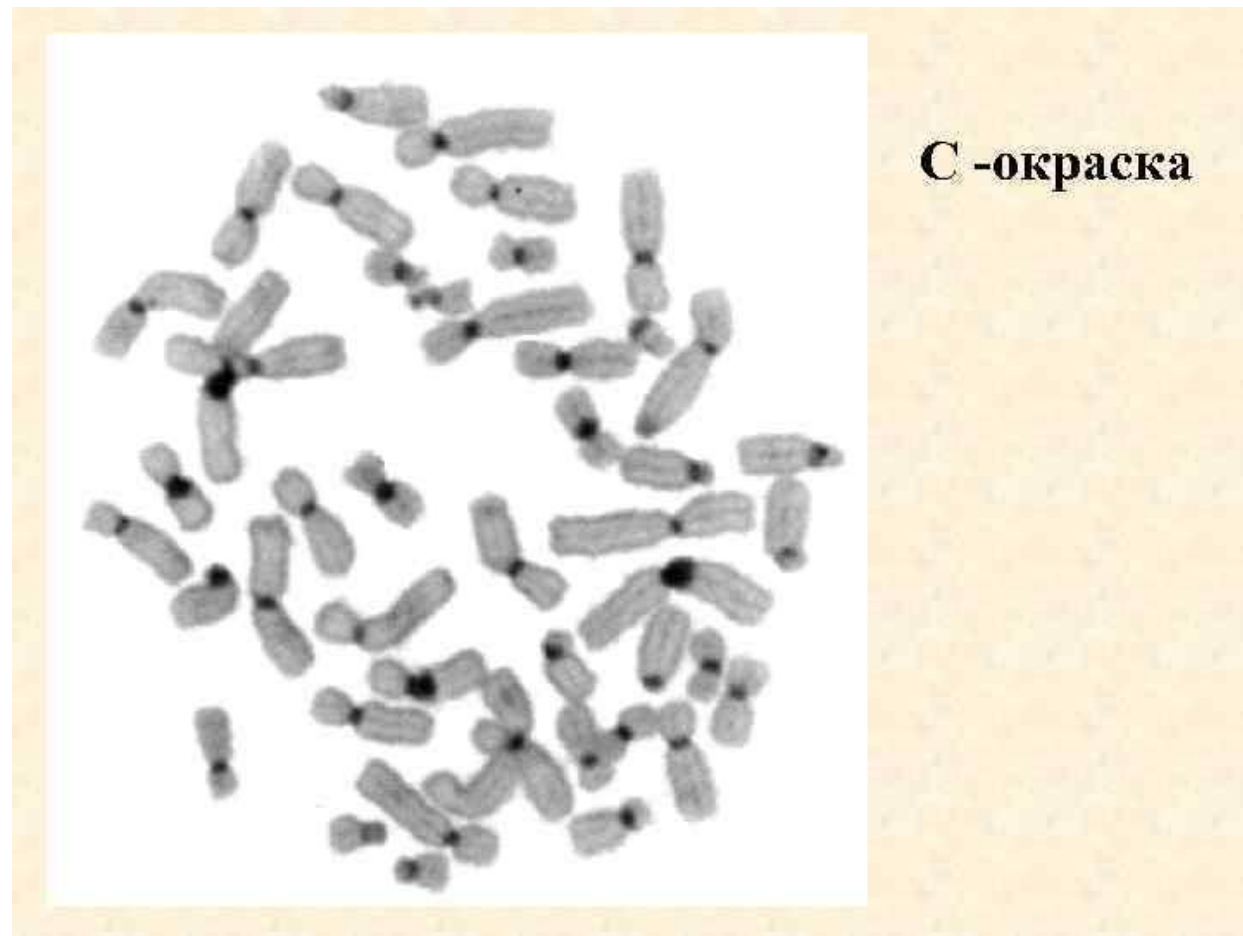


Чередование бэндов в хромосоме X, полученное разными методами дифференциальной окраски.

C-окрашивание

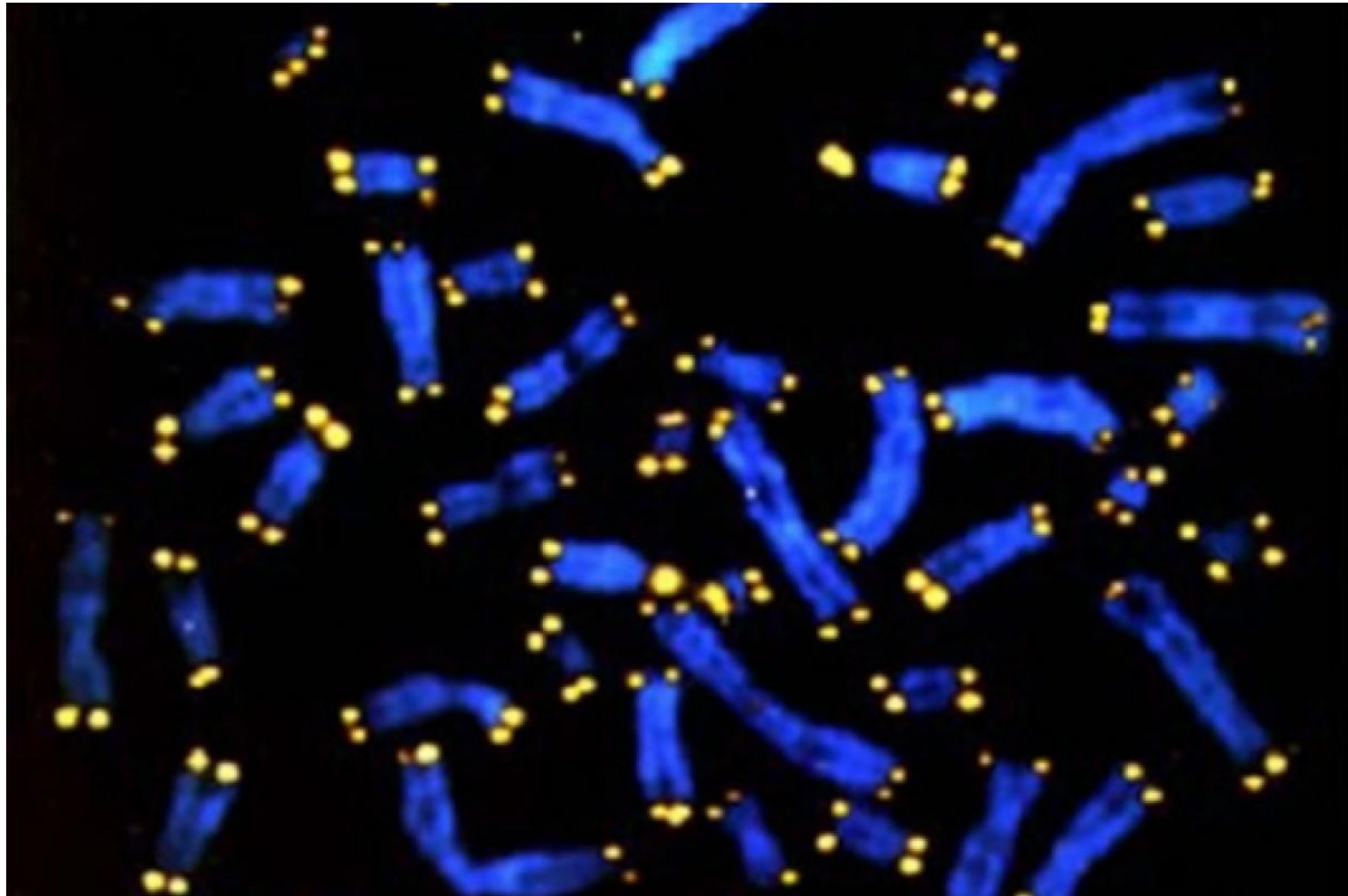
Применяется для анализа центромерных районов хромосом, содержащих конститутивный гетерохроматин и вариабельной дистальной части Y-хромосомы.

Гетерохроматин — тип хроматина, который всегда остается в конденсированном состоянии и окрашивается в



T-окрашивание

Применяют для анализа теломерных районов хромосом.



Ломкие участки — неокрашиваемые промежутки, иногда наблюдаемые в характерных местах в различных хромосомах.

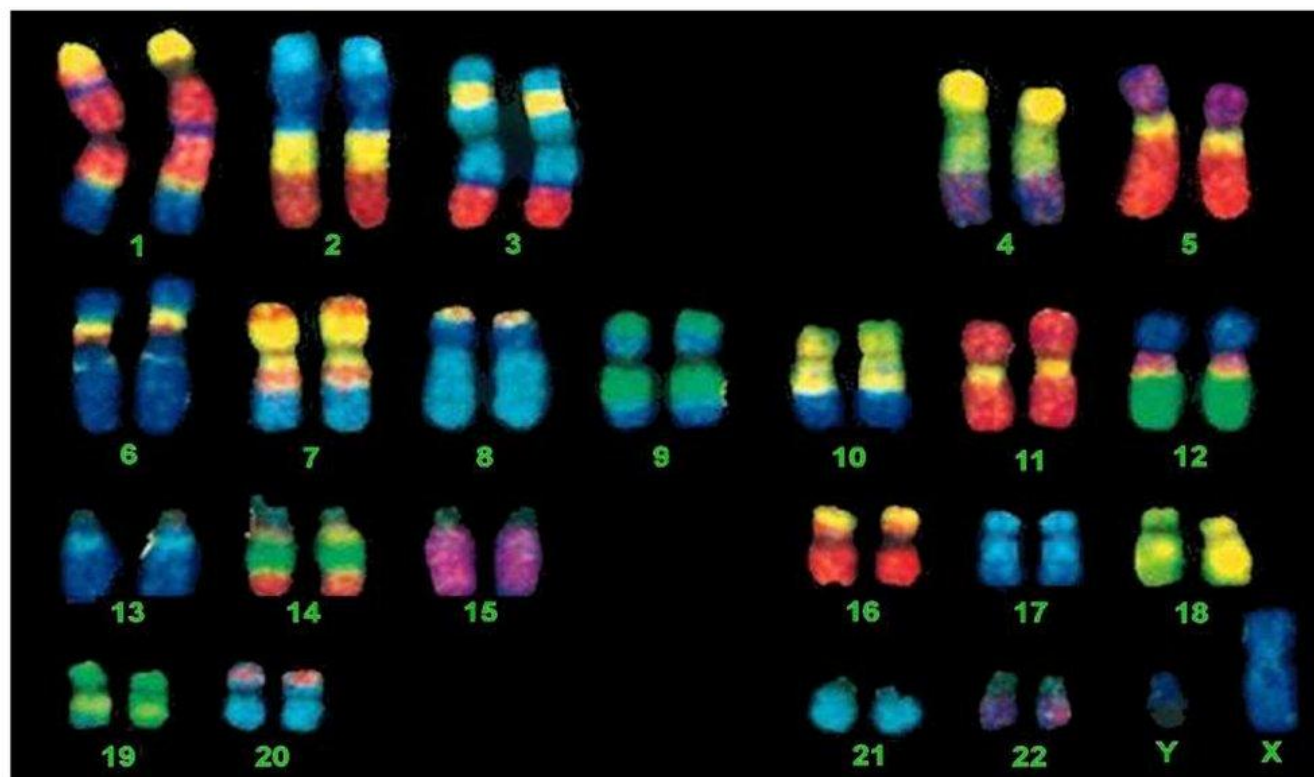
Известно множество наследуемых вариантов ломких участков. Наиболее очевидно клиническое значение ломких участков на **длинном плече X-хромосомы у мальчиков** с часто встречающейся специфической формой сцепленной с полом умственной отсталости, а также у некоторых женщин — носителей этого генетического дефекта.

Обнаружение ломкого участка в X-хромосоме — диагностическая процедура, специфичная для синдрома ломкой X-хромосомы, хотя в большинстве лабораторий этот тест заменен или дополнен молекулярным тестированием для обнаружения экспансии тринуклеотидного повтора CGG в гене этого заболевания FMR1.

Флуоресцентная гибридизация

Состоит в окрашивании хромосом набором флуоресцентных красителей, связывающихся со специфическими областями хромосом. В результате такого окрашивания гомологичные пары хромосом приобретают идентичные спектральные характеристики, что не только существенно облегчает выявление таких пар, но и облегчает обнаружение межхромосомных транслокаций.

FISH -метод – Fluorescent *in situ* hybridization дал еще больше возможностей



Преимущества гибридизации:

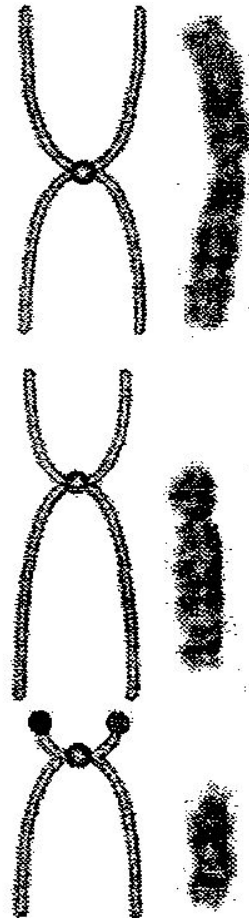
1. Способность обнаружить микроделеции
2. Исследуются не только метафазные клетки, но и интерфазное ядро
3. Выявление злокачественных онкозаболеваний
4. Используют в пренатальной и преимплантационной диагностике.

Идентификация хромосом

По положению
центромеры:

1. Метacentрические хромосомы
2. Акроцентрические хромосомы
3. Субметacentрические хромосомы

Потенциальный четвертый тип хромосом, **телоцентрический**, с центромерой на одном конце и единственным плечом, **не представлен в нормальном кариотипе**



метacentрические:

$I_c = 46 - 49\%$

субметacentрические:

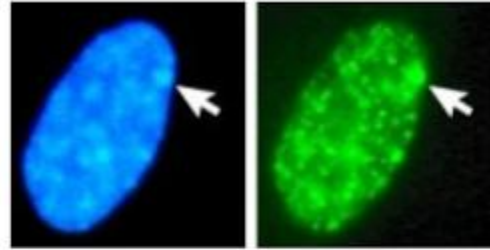
$I_c = 31 - 45\%$

акроцентрические:

$I_c = 17 - 30\%$

Определение полового хроматина

У женщин (46, XX) одна X-хромосома является активной, а другая X-хромосома находится в неактивном, спирализованном состоянии. Половой X-хроматин в норме выявляется только у женщин и отсутствует у мужчин.

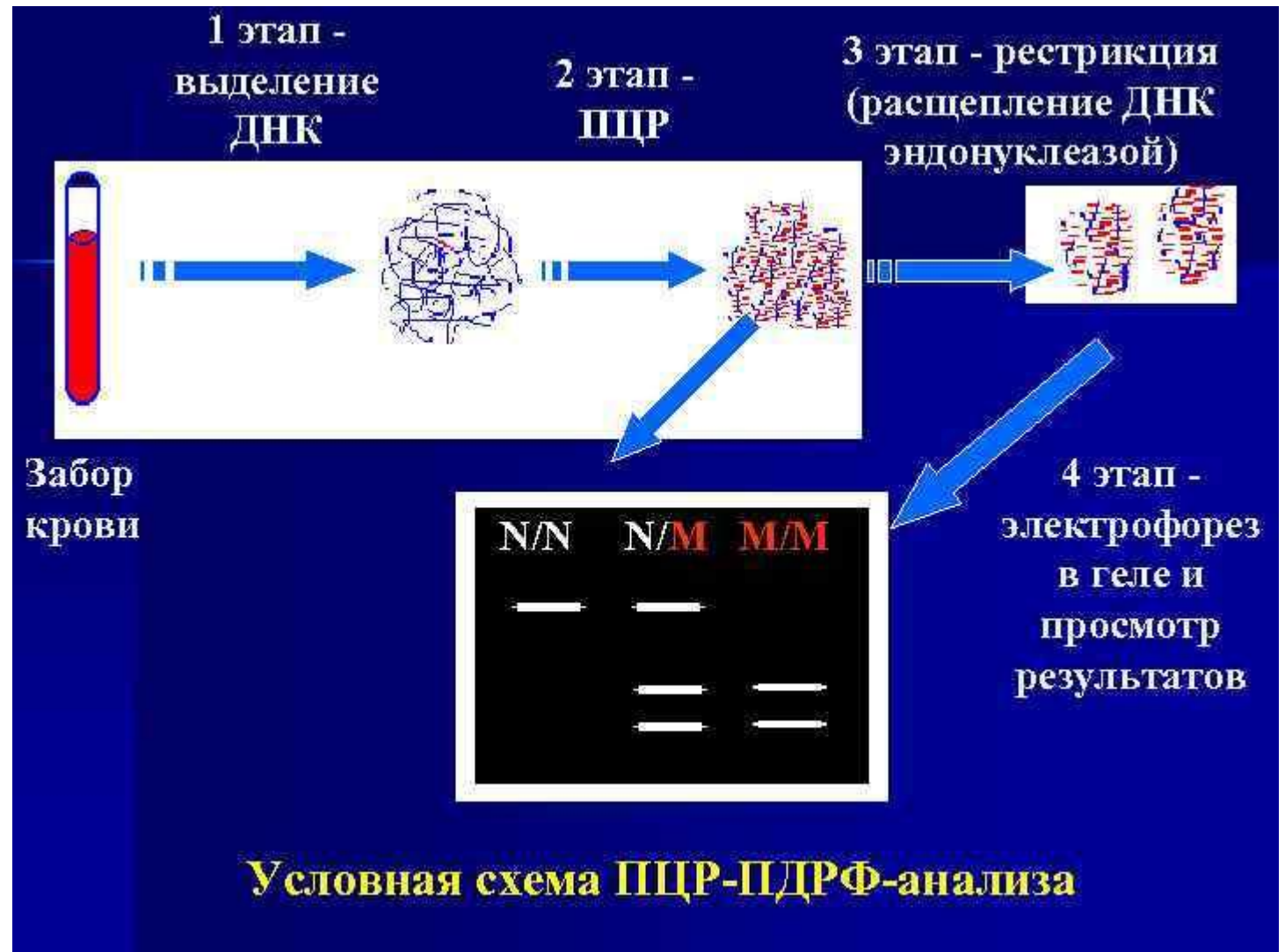


Ядро фибробласта женщины, окрашенное флуоресцентным красителем. Стрелкой указано тельце Барра.

- **Тельце Барра** – это X-хромосома в покоем состоянии.
- **Число телец Барра всегда на единицу меньше числа наличных X-хромосом**, т. е. у мужчин их нет, а у женщин – только одно.

1.2 Молекулярно-генетические методы

1. Выделение ДНК
2. Подготовка биоматериала
3. Исследование небольшого фрагмента ДНК
4. Амплификация ДНК методом ПЦР (денатурация, гибридизация, полимеризация)



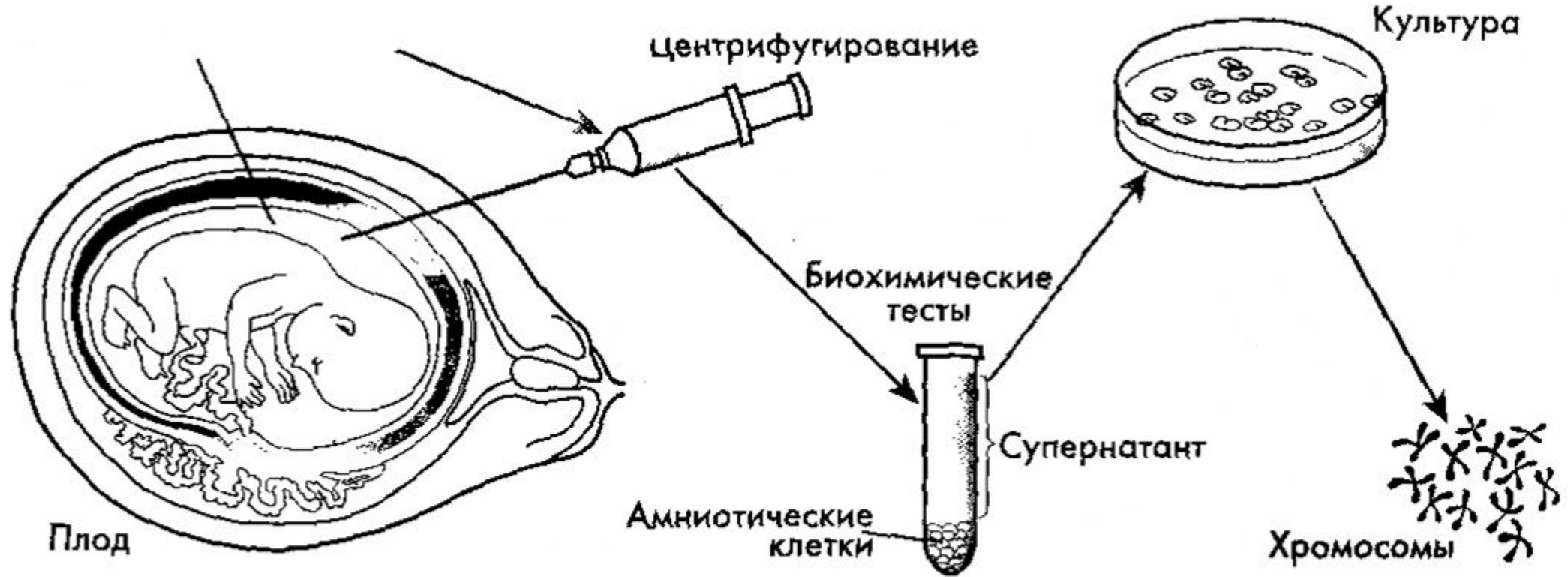
ПЦР включает три стадии:

1. Денатурацию - процесс разъединения двойной спирали на комплементарные одноцепочечные нити (первая стадия ПЦР).

2. гибридизацию - образование двойных цепей ДНК, или копирование одноцепочечных молекул ДНК. Реакция протекает в течение 30 с при снижении температуры с 90 °С до 50 °С при участии фермента термостабильной ДНК-полимеразы.

3. Полимеризацию - третья стадия цикла ПЦР, в ходе которой при увеличении температуры с 50 °С до 72 °С ДНК-полимераза присоединяется к 3'-концам праймеров и удлиняет оба праймера с их 3'-концов до размеров матричной нити ДНК. Разрезание ДНК на фрагменты осуществляется рестриктазами, и получение набора фрагментов длиной в 4–6 нуклеотидов. Деление ДНК на части необходимо, так как проводить анализы с огромными молекулами ДНК невозможно.

1.3. Биохимические методы



Биохимические методы позволяют диагностировать наследственно обусловленное **нарушение обмена веществ**. Многие наследственные заболевания обмена веществ – **генные мутации** связаны с ферментопатиями. Материалом биохимической диагностики являются: **моча, кровь, культуры клеток фибробластов и лимфоцитов**.

• **Биохимическую диагностику проводят в два этапа:**

- 1. На первом этапе** отбирают предположительные случаи заболеваний, на втором - более точными и сложными методами уточняют диагноз заболевания. Первый этап включает качественные и количественные тесты с мочой и кровью на белок, кетокислоты, цистин и гомоцистин, креатинин и другие показатели.
- 2. *Второй этап*** основан на более точных методах, позволяющих обнаружить большие группы биохимических аномалий. Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать нарушения обмена аминокислот, олигосахаридов и гликозаминогликанов (мукополисахаридов).