

**БИОЛОГИЯ ИЛИМДЕРИ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**  
**BIOLOGICAL SCIENCE**

*Темирова С.А.*

**ГИБРИДНИК КЛЕТКАЛАРДЫН ГЕНОМУНУН ПЛЮРИПОТЕНТУУЛҮГҮН  
БААЛОО ҮЧҮН КОЛДОНУЛГАН ЦИТОГЕНЕТИКАЛЫК МЕТОДДОР**

*Темирова С.А.*

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ  
ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ГЕНОМА ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК**

*S.A. Temirova*

**CYTOGENETIC METHODS USED FOR ASSESSMENT OF PLYURIPOTENTION OF  
THE HYBRID CELL GENOME**

УДК: 574:502.7

Цитогенетика клеткалык структуралардын деңгээлиндеги тукум-куучулук жана өзгөргүчтүктүн механизмдерин изилдөөчү генетиканын бир тармагы болуп эсептелет. Акыркы жылдардагы цитогенетикалык методдордун өнүгүүсү негизинен интерфаздык ядродогу же хромосоманын составындагы ДНК-нын конкреттүү түрмөгүн аныктоо жана көрүү мүмкүнчүлүгүнүн пайда болуусу менен байланышкан. Цитологиялык структуралардагы ДНК-нын белгилүү түрмөгүн көрүү үчүн флуоресценттик гибридизация *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) кеңири колдонулуп келет. Ошондой эле, акыркы жылдардагы молекулярдык биологиянын жетишкендиктери жана микроскопиянын жаңы типеринин пайда болуусу сүт эмүүчүлөрдүн хромосомаларын изилдөөдө фантастикалык прогрессти камсыздаган принципиалдык өзгөрүүлөгө алып келди.

**Негизги сөздөр:** хромосомалар, ДНК-пробалар, бэнд, детекция, микроскопия, визуалдаштыруу, FISH.

Цитогенетика представляет собой область генетики, изучающую механизмы наследственности и изменчивости на уровне клеточных структур, главным образом хромосом. Прогресс в развитии цитогенетических методов в последние годы был связан, главным образом, с совершенствованием детекции и визуализации конкретных последовательностей ДНК в составе хромосом, распластанном хроматине или в интерфазных ядрах. Для визуализации в цитологических структурах соответствующих последовательностей ДНК наиболее широко используется флуоресцентная гибридизация *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH). Также, достижения последних лет в молекулярной биологии и развитие новых типов микроскопии принципиально изменили ситуацию в исследованиях хромосом млекопитающих, обеспечив фантастический прогресс в изучении хромосом.

**Ключевые слова:** хромосомы, ДНК-пробы, бэнд, детекция, микроскопия, визуализация, FISH.

Cytogenetics is the area of genetics that studies the mechanisms of heredity and variability at the level of cellular structures, mainly of chromosomes. Progress in cytogenetic techniques in recent years has been associated mainly with

improving the detection and visualization of specific DNA sequences in the composition of chromosomes, in flat out chromatin or in interphase nuclei. For visualization in cytological structures corresponding DNA sequences, most widely used Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Also, recent advances in molecular biology is the development of new types of microscopy, they radically changed the situation in studies of mammalian chromosomes, providing fantastic progress in the study of chromosomes.

**Key words:** chromosomes, DNA samples, band, detection, microscopy, visualization, FISH.

**Введение.** Впервые хромосомы были описаны как окрашиваемые клеточные структуры, которые становились видимыми в ходе клеточного деления. Почти 100 лет их изучение проходило в рамках морфологического анализа. Однако основным подходом был не анализ хромосомы, максимально сохранившей свою исходную морфологию, а изучение реакции хромосомных районов на различные воздействия и обработки, проводимые перед микроскопией.

**Задачи:**

1. Описать современные цитогенетические методы анализа хромосом млекопитающих.
2. Рекомендовать применять изложенные методы в исследованиях связанных с изучением организации хромосом и диагностикой хромосомных патологий.

**Ожидаемые результаты:**

1. Все вышеописанные современные методы цитогенетического анализа должны широко применяться в исследованиях связанных анализом организации хромосом.
2. Решение данных проблем требует привлечения широкого методического арсенала, над созданием которой нужно работать.

**Обсуждение.** Для рассмотрения вопросов, затронутых в дальнейшем, необходимо также, перечислить основные районы, из которых и состоит хромосома. Эти районы характеризуются особой ор-

ганизацией, составом ДНК и выполняют особые функции.

Центромерный район – район первичной перетяжки, где локализован домен хромосомы, ответственный за формирование кинетохора и движение хромосом в митозе и мейозе.

Теломера – особая структура на конце хромосомы, обеспечивающая полную репликацию ДНК хромосомы, защиту концевых районов от перестроек.

Плечо хромосомы – район хромосомы от теломеры до центромеры.

Также, нельзя оставить без внимания элемент хромосомы, описываемый термином «бэнд», пришедшим к нам из англоязычной литературы. Он представляет собой район хромосомы, который ясно отличается от соседних районов по интенсивности при использовании методов дифференциального окрашивания. Следует отметить, что бэнд имеет большое значение для правильной структурно-функциональной организации хромосом.

В цитогенетике, как и в большинстве областей цитологии, одним из ключевых моментов является подготовка образца для его детального исследования. Однако подготовка хромосом для анализа в цитогенетике связана не с максимальным сохранением исходной структуры, а с оказанием на них воздействия, которое, приводя к значительным изменениям их морфологии, позволяет проявить специфику их структурной организации. Такие воздействия на хромосому начинаются еще при подготовке клеток к фиксации: введение колхицина или колцемида не только увеличивает выход митотических клеток, но приводит к уменьшению длины фиксированных метафазных хромосом на предметном стекле, выпрямлению хромосомных плеч, более четкому выявлению перетяжек. Накопление митотических клеток можно разделить на два этапа: 1) получение пролиферирующих клеток, для этого из интересующего объекта выделяют клетки, которые могут быть стимулированы к пролиферации (клетки периферической крови, костного мозга, селезенки, фибробласты из различных органов и тканей и т.д.). Выделенные из крови клетки помещаются в специальную культуральную среду, содержащую митогены (Н: фитогемагглютинин (ФГА)). Вторым этапом это накопление митотических клеток. Для этого необходимо введение в культуральную среду колхицина или колцемида. Они, нарушая формирование клеточного веретена, препятствуют клеточному делению, увеличивая, таким образом, число клеток, находящихся в метафазе.

Гипотония увеличивает площадь, на которой распластывались хромосомы и влияет на их длину. Условия нанесения фиксированных клеток на предметное стекло также имеют огромное значение для окончательного формирования морфологии распластанных хромосом.

В ходе фиксации клеток при первом же контакте клетки со стандартным фиксатором (метанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) мембрана клетки разрушается и размер клетки несколько уменьшается, так как присутствующая в клетке вода уходит в фиксатор.

Распластывание хромосом на стекле является одним из важных и ответственных моментов при приготовлении препаратов. Чтобы добиться хороших результатов, нужно нанести суспензию фиксированных клеток в свежеприготовленном фиксаторе на поверхность чистого предметного стекла. Мы должны уделять большое внимание на подготовку цитологических препаратов, так как от этой части работы очень часто зависит успех или неудача в проведении какого-то исследования или даже появления странных и неожиданных феноменов, которые могут оказаться просто результатом ошибки, совершенных на самом первом этапе работы.

Большинство методов дифференциального окрашивания основано на различной чувствительности хромосомных районов к тепловой и ферментативной обработке. Использование инеркалирующих красителей ДНК, отличающихся по интенсивности окрашивания АТ- и ГЦ-богатых районов, позволило дифференцировать некоторые хромосомные районы. Следующим шагом в хромосомном анализе стало использование феномена стадиоспецифичной репликации ДНК хромосомных районов.

Принципиальные изменения в технологии хромосомного анализа оказались связанными с созданием и дальнейшим развитием молекулярных методов хромосомного анализа. Таких как гибридизация нуклеиновых кислот *in situ*. Новые методы позволили перейти от изучения морфологии хромосом к исследованию распределения в них конкретных последовательностей ДНК. Решение такой задачи возможно двумя различными способами:

- визуализацией на цитологических препаратах соответствующих последовательностей ДНК. Мечение ДНК представляет собой модификацию, позволяющую детектировать меченую ДНК на цитологическом препарате после гибридизации *in situ*. Прямое мечение предполагает введение в ДНК элементов, которые могут быть непосредственно выявлены при последующей микроскопии. Для прямого мечения ДНК используют различные флуорохромы, такие как флуоресцеинизотионинат (FITC), родамин, цианиновые красители и многие другие. При непрямом способе мечения в качестве репортерных элементов широко используется биотин и дигоксигенин. Непрямой вариант мечения обычно позволяет добиться уровня сигнала, в несколько раз превышающего сигнал при использовании прямо меченной ДНК-пробы.

Для одновременной визуализации материала всех хромосом человека необходимо использовать 24 уникальным образом меченные хромосомо-

специфические ДНК-пробы. Впервые эта задача была решена в 1996 г. при разработке 24-цветной FISH (Schroeck et al., 1996). В ее основе лежит комбинаторное мечение. При котором ДНК-пробы мечаются не одним флуорохромом, а их комбинацией. Анализ микроизображений. Полученных при раздельной регистрации шести флуорохромов (пять флуорохромов использовалось для мечения ДНК-проб, шестой DAPI для общего окрашивания хромосом), позволяет определять хромосомную принадлежность любого района как нормальных, так и перестроенных хромосом. Методы 24-цветной FISH эффективны при выявлении межхромосомных перестроек, затрагивающих негомологичные хромосомы, вне зависимости, приводят они к изменению копийности хромосомных районов или нет.

- созданием ДНК-проб из анализируемого объекта для последующего выяснения вопроса: присутствует или отсутствует в них интересующего исследователя последовательности ДНК? ДНК-проба – это фрагмент или фрагменты нуклеиновых кислот, меченные таким образом, чтобы было возможно проведение их детекции при микроскопии после гибридизации *in situ*. Они могут быть клонированными последовательностями ДНК, общей геномной ДНК или продуктом ПЦР.

Создание новой приборной базы для микроскопии, регистрации и обработки полученных результатов превратило гибридизацию нуклеиновых кислот *in situ* и люминесцентную микроскопию в мощный инструмент хромосомного анализа и диагностики. Системы многоцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (M-FISH) позволили проводить одновременную визуализацию на препарате материала всех хромосом человека и хромосомных районов индивидуальных хромосом. Создание комплектов специфических ДНК-проб открыло эру хромосомного анализа в интерфазных ядах, детекции хромосомных перестроек нарушающих баланс генов, создания ЧИПов для определения делеций, дупликаций, транслокаций.

Значительным событием цитогенетики последних лет явился переход от анализа хромосомы, распластанной на предметном стекле, к изучению организации хромосомы в трехмерном пространстве, фиксированной и интактной хромосомы в живой клетке. Использование лазерной сканирующей микроскопии в совокупности с различными системами мечения ДНК и белков позволили визуализировать

индивидуальные хромосомы, проследить за перемещением конкретных последовательностей ДНК и целых хромосом в живой клетке.

**Заключение:** Мы считаем, что необходимо применять современные цитогенетические методы в разработке и использовании новых методов анализа для повседневной медицинской диагностики, современную медицину уже невозможно представить без пре- и постнатальной диагностики хромосомных аномалий, анализа реорганизации хромосом при онкологических заболеваниях. Также, в частности, цитогенетические методы должны использоваться в проведении исследований на гибридных клетках типа ЭС-дифференцированная клетка, для установления соотношения родительских хромосом в гибридном геноме и их эволюции при культивировании *in vitro*. Знание о реальном соотношении родительских хромосом абсолютно необходимо как для оценки плюрипотентности генома гибридных клеток, так и для понимания механизмов репрограммирования хромосом дифференцированных клеток.

Цитогенетика XXI в., несомненно, внесет свой значительный вклад в расшифровку основных законов формирования, поддержание и функционирование генома человека и других видов млекопитающих.

#### Литература:

1. Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих: Атлас. Новосибирск: Наука. Сиб. отд., 1988. С. 1-128.
2. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH / M.R. Speicher, G. Ballard, D.C. Ward / Nat. Genet. 1996. V. 12, P. 368-375.
3. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes / I. Chuboda, A. Plesch / Cytogenet. Cell. Genet. 1999. V. 84. P. 156-160.
4. Improvements in Cytogenetic Slide Preparation: Controlled Chromosome Spreading, Chemical Aging and Gradual Denaturing / O. Henegariu, N.A. Heerema, L.L. Wright / Cytometry. 2001. V. 43. P. 101-109.
5. Серов О.Л., Матвеева Н.М., Кузнецов С.Б., Кафтановская Е.М. Эмбриональные гибридные клетки: новые возможности в изучении плюрипотентности и репрограммирования хромосом дифференцированных клеток // Известия АН. 2001. №6. С. 711-716.
6. Эралиева Н.М. Морфофизиология и кариотип сарычелекской маринки. Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2016. № 6. С. 61-63.

Рецензент: к.биол.н. Тюмонбаева Н.Б.