

УДК 681.5:61

В.П. КОЖЕМ'ЯКО, С.О. ШТЕЛЬМАХ

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТАТІ ІНДИВІДУУМА ЗА ДАНИМИ ЦИТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ. ВИКОРИСТАННЯ Т – ПРОМЕНІВ (ТГЦ ВИПРОМІНЮВАННЯ) ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТАТІ ТА АНОМАЛІЙ СТАТЕВИХ ХРОМОСОМ

*Вінницький національний технічний університет
95, Хмельницьке шосе, м.Вінниця, Україна
Тел. +38(0432)598125, факс (0432) 465772
E-mail: psy@vstu.vinnica.ua*

Анотація. Робота присвячена новим методам визначення генетичної статі індивідуума за даними цитологічного дослідження за допомогою Т – променів.

Аннотация. Работа посвящена новым методам определения генетического пола индивидуума за данными цитологического исследования при помощи Т – лучей.

Abstract. Work is devoted to new methods of determination of sex of individuals after data of cytological research through T - rays.

ВСТУП

Визначення клітин слизової оболонки порожнини рота — так званий буккальний тест (від лат. "бисса" - щока) — являється простим неінвазійним методом визначення генетичної статі. Він оснований на виявленні в ядрах епітеліоцитів тільця Барра — скупчення гетерохроматину, відповідаючого спеціалізованій та функціонально неактивній однієї з двох Х — хромосом у жінок. Тільце Барра в ядрах епітеліальних клітин слизової оболонки порожнини рота має вид щільної гранули діаметром менше 1 мкм, яка розташована безпосередньо під ядерною оболонкою.

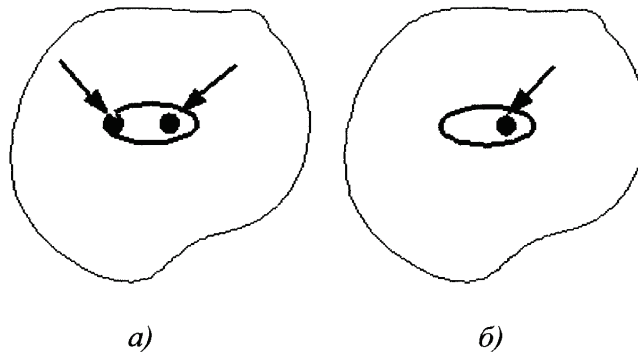


Рисунок 1. Тільце Барра (показано лівою стрілкою) в ядрі епітеліальної клітини слизової оболонки порожнини рота на цитологічному мазку (рис.1,а). Ядро клітини справа (рис.1,б) не містить тільце Барра. Темна стрілка — ядришко

Для підвищення надійності тестування, крім тільця Барра, проводиться ідентифікація Y — хромосоми шляхом зафарбовування хінакрином. Виявлення проводиться за допомогою спеціальної установки, яка представлена нижче, на рис.3., як і визначення тільця Барра.

Стать індивідуума визначається як жіночий у випадку позитивного результату першого

тесту(визначення тільця Барра) та негативного другого (визначення Y- хромосоми), а чоловіча стать — як протилежні результати.

Таблиця 1.
Ідентифікація результатів

Стать	Тільце Барра	Y – хромосома
Чоловіча	-	+
Жіноча	+	-

Найбільш підходящою фазою для вивчення хромосом являється метафаза метозу. Для цього найчастіше використовують препарати короткотривалої культури крові, яку отримують через 48-72 години після взяття крові, але можуть використані клітини кісткового мозку та , як в нашому випадку, культури фібробластів (епітеліальні клітини ротової порожнини — буккальний тест).

При приготуванні препаратів хромосом до культури клітин додають колхіцин, який руйнує веретено ділення та зупиняє ділення клітини в метафазі. Потім клітини оброблюють гіпотонічним розчином, після чого їх фіксують та зафарбовують. Далі такі клітини, за допомогою світла проходять аналіз.

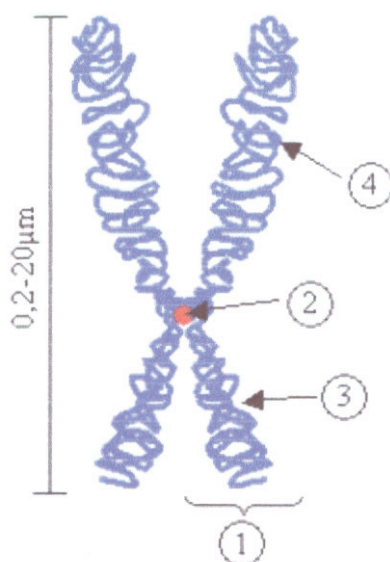


Рисунок 2. Хромосома в метафазі метозу:

1 — хроматида; 2— центромера ;3 — коротке плече q; 4- довге плече p

На сьогодні існують такі основні цитогенетичні методи:

- стандартні цитогенетичні методи;
- високочутливі цитогенетичні методи;
- молекулярно — цитогенетичні методи (FISH-метод та його різновиди);

СТАНДАРТНІ ЦИТОГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ

Для забарвлення хромосоми частіше використовують барвник Романовського — Гімзи, 2% ацеткармін, 2% ацетарсеїн. Вони зафарбовують хромосоми повністю, рівномірно і використовуються для визначення кількісних аномалій хромосом людини (45,47 і інш.). За даними деяких авторів [1] лише 30% від наявної кількості хромосомної патології можливо виявити за допомогою даного методу.

Більш сучасним різновидом стандартних методів є диференційне забарвлення препаратів хромосом.

Ще в 1968 році Caspersson та інші дослідники виявили лінійну неоднорідність хромосоми по довжині - чергування темно - та світлозабарвлених смуг (бендів, від англ. “bands”) при диференційному забарвленні хромосоми. З цього моменту стало можливим ідентифікувати кожен хромосом окремо. Дані методи базуються на специфічній постфіксаційній обробці готових препаратів хромосом та вивченні її структури. Рівень сегментів при цьому складає 200 - 400 на гаплоїдний набір [1]. Методи

диференційного забарвлення поділяють на Q- метод, G-метод, R - метод. В основі цих методів лежить застосування спеціальних барвників, або попередня термічна обробка препаратів хромосом, обробка за допомогою розчинів протеолітичних ферментів (трипсин, пепсин) чи солей (2xSSC).

Q - метод (quinacrine, акрихін) дозволяє ідентифікувати індивідуальні хромосоми , в нашому випадку це - Y - , X - хромосоми , визначати структурні аномалії при проведенні пре - та постнатальної діагностики, визначати поліморфізм в дистальній ділянці довгого плеча Y - хромосоми. Ділянки хромосом, які флуорисцують після забарвлення акрихін - іпритом або подібною сполукою.

G - метод (Giemsa, Гімза) використовується при зафарбовуванні барвником Гімза у поєднанні з додатковими процедурами, які сприяють тому, щоб барвник адсорбувався найбільш інтенсивно на певних ділянках. Q- та G - сегменти ідентичні. У більшості лабораторій в щоденній роботі віддають перевагу G - методу, оскільки він не потребує використання флуоресцентного мікроскопу та забарвленні препарати можливо зберігати довгий час. Однак специфічна перевага Q - методу в тому, що навіть в інтерфазному ядрі є можливість ідентифікувати Y - хромосому людини за яскравою флуоресценцією.

R - метод (reverse, обернений) забарвлення після контрольованої теплової денатурації. Отримуємо малюнок сегментації хромосом, який протилежний Q- та R - методів. R- сегмент розташовується між Q- сегментами, або G - сегментами. Використовується в таких же випадках , що і G - метод, а також візуалізує термінальні ділянки хромосоми та R - позитивні ділянки, втягнуті в перебудову хромосоми.

C - метод (constitutive heterochromatin, конститутивний гетерохроматин) дозволяє забарвлювати центромерний район в усіх хромосомах та гетерохроматин вторинних навколоцентромерних перетяжок, гетерохроматин коротких плечей акроцентричних хромосом та довгого плеча Y — хромосоми. Також даний метод дозволяє виявляти дицентричні хромосоми, допомагає ідентифікувати деякі прицентромерні інверсії, а також виявляти прицентромерний гетерохроматин в маркерних хромосомах. Оскільки кожен з методів має модифікації, номенклатура хромосом передбачає застосування трьохлітєрної системи позначення забарвлення, де перша літера позначає основний метод забарвлення, друга - застосований варіант попередньої обробки препарату, а третя літера — назву барвника.

ВИСОКОЧУТЛИВІ ЦИТОГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ

Високочутливі цитогенетичні методи збільшують частку ідентифікації хромосомних аномалій до 75% [1]. Хромосоми в профазі та прометафазі конденсовані не стільки сильно, як метафазні хромосоми. При обробці культури лімфоцитів метотрексатом (для часткової синхронізації клітинного циклу) можна накопичити достатньо клітин , які знаходяться в профазі та прометафазі. Зменшення часу інкубації з колцемідом дозволяє уникнути сильної конденсації. В препаратах таких хромосом окремі сегменти, які виявляються стандартними методами, можна розділити на субсегменти. Ступень розрішення залежить від стадії, на якій клітини були зафіксовані. Деякі автори описують більше 2000 сегментів [6] . Звичайно в пізній стадії профазі можна побачити 800— 1200 сегментів [1]. Цей метод не замінює стандартних методів, проте він надзвичайно привабливий при ідентифікації точок розриву та мілких аберацій, в цитогенетиці пухлин.

МОЛЕКУЛЯРНО — ЦИТОГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ (FISH-МЕТОД ТА ЙОГО РІЗНОВИДИ)

Флуоресцентна in situ гібридизація — FISH почала з'являтися на початку 90—х років. FISH дала новий етап у дослідженні хромосомної патології та науковій діяльності. Частка ідентифікації хромосомних аномалій при цьому методі складає 95 — 99% [1] . Гібридизація in situ дозволяє визначити, в якому сегменті знаходиться відповідний маркер. Флуоресцентна in situ гібридизація дозволяє картувати декілька різних забарвлених маркерів ДНК, а гібридизація в період інтерфази — визначити порядок маркерів в окремих ділянках хромосоми.

Препарати фіксованих хромосом гібридизують (інкубують при підвищенні температури з послідовним охолодженням) з досліджуваними послідовностями нуклеотидів помиченими радіоактивною (³H та інш.), флуоресцентною або іншою міткою (маркер). Після відмивання нез'язаної мітки решта помичених молекул нуклеїнових кислот асоційовані з ділянками хромосом , які містять послідовності, комплементарні досліджуваним послідовностям нуклеотидів. Отримані гібриди досліджуються за допомогою методів мікроскопії (світлової, електронної) , або після авторадіографії. Для цієї групи методів характерне більш висока розрішаюча здатність. В результаті великого розвитку даного методу, з'явився новий розділ цитогенетики — інтерфазна цитогенетика. Значну роль в розвитку

варіантів FISH дало використання нових методів мікроскопічного зображення. Йдеться мова про використання CCD — камер (CCD — камер з високим рівнем розрешення, охолоджуваними CCD) — камер з довготривалим часом накопичення сигналу) з відповідним комп'ютерним забезпеченням. Це дало можливість спрощення процес реєстрації, нові можливості для подальшого дослідження.

1. Використання псевдоколіру. Крім реєстрації інтенсивності сигналу, сучасна техніка дозволяє виділити його спектральні характеристики. Йдеться мова про спектральне каріотипування SKY. Наразі зараз достатньо використання чорно — білого зображення. Інтенсивність світіння кожного флюорохрому записується окремо за допомогою спеціальних фільтрів (збуджувачого та запираючого). Для кожного такого зображення дається свій унікальний (неповторний) псевдоколір. Така система, де використовують флюорохроми з неперекриваючими спектрами емісії та збудження, дозволяє використовувати їх в одному експерименті. Кількість ДНК проб при використанні N флюорохромів можна вирахувати за формулою: $2^N - 1$.

2. Метод 24 – колір FISH. Каріотип людини складається з 22 аутосом (нестатевих клітин) та статевих хромосом X та Y. Тому необхідно щонайменше 24 унікальні ДНК проби. Для мічення хромосом необхідно 5 флюорохромів – $2^5 - 1 = 31$. Хромосомспецифічні ДНК бібліотеки мітяться унікальними комбінаціями трьох флюорохромів. В результаті FISH кожній хромосомі відповідає свій псевдоколір.

Такий метод хромосомного аналізу дозволяє виявляти та ідентифікувати будь — які транслокації матеріалу негомолігічних хромосом.

Якщо хромосома забарвлена більш ніж одним кольором, то це інформує про транслокацію. Колір хромосомних районів дає чітку картину про хромосоми, які приймали участь в даній хромосомній перебудові. Крім того диференційна неоднорідність хромосоми нерідко дозволяє провести ідентифікацію точок з'єднань — розривів, які мали місце при хромосомній перебудові. Первинний аналіз каріотипу при цій методиці може бути отриманий менш ніж за дві доби. При цьому результати будуть досить достовірними. Тільки для важких випадків необхідно використовувати додаткові дослідження. Але для внутрішньохромосомних змін (делеція, інверсія, дуплікація) залишаються невидимими для цього методу.

3. R_xFISH - метод. Основа методу полягає в тому ж самому принципі FISH, але на відміну від 24— колірної FISH, дозволяє виявляти частину внутрішньохромосомних перебудов. Даний метод має три флюорохрома, отже, можна отримати 7 псевдоколірів ($2^3 - 1 = 7$). Вони специфічно забарвлюють окремі райони хромосом. Всі проби забарвлюють декілька хромосомних районів різних хромосом. Специфічність ДНК проб пояснюється їхнім джерелом отримання - *Hylobates concolor* та *Hylobates syndactylus*. В результаті інтенсивних хромосомних перебудов, яке відбувалось при формуванні сучасних гібонів, матеріал їх хромосом виявився сильно перемішаним у порівнянні з хромосомами у загального нащадка, а також у людини. Але при внутрішній перебудові в межах одного кольорового бенду, не може бути використаний. Якщо використовувати більшу кількість флюорохромів, то даний метод дозволяє більш інформативно вивчати хромосоми людини, ніж 24— колір FISH.

Даний метод дозволяє автоматизувати процес визначення хромосом людини, ідентифікувати значну внутрішньо- та міжхромосомні перебудови, для кожної хромосоми існує свій окремий баркод, можливо інтегрування в різні комп'ютерні системи (Cyto Vision і інш.)

Разом з тим, такі хромосоми як 15,18,19,21 ,22,X,Y представляють один кольоровий бенд (однокольорове зображення).

4. M -FISH - метод. Дана методика використовується для детального аналізу окремої хромосоми. Для цього було розроблені мікродисекційні ДНК проби та відповідне програмне забезпечення для порівняльного аналізу рівня світіння різних флюорохромів. Районспецифічні ділянки хромосоми помічаються своїм окремим флюорохромом. В результаті формується ціла мікродисекційна районспецифічна бібліотека. Рівень сигналу кожної з такої бібліотеки змінюється від максимуму в центрі і поступово спадає до нуля на границі. Варіації співвідношення інтенсивності флюорисценцій різних флюорохромів вздовж хромосоми забезпечується перекриттям профілями інтенсивності сигналу ДНК проб. В результаті програмній обробці зображення кожному з районів хромосоми дається свій псевдоколір. Дана методика дозволяє ідентифікувати не тільки міжхромосомні, але й внутрішньохромосомні перебудови. Для того, щоб вивчити X - або Y — хромосоми, їх потрібно спочатку ідентифікувати.

ВИКОРИСТАННЯ Т – ПРОМЕНІВ (ТГЦ ВИПРОМІНЮВАННЯ) ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТАТІ ТА АНОМАЛІЙ СТАТЕВИХ ХРОМОСОМ

В статті запропоновано визначення генетичної статі та аномалій статевих хромосом за

допомогою ТГц випромінювання.

Найважливішою характеристикою ТГц випромінювання є абсорбція молекулами води. Це може бути використано для визначення різниці між різними тканинами (приклад, між м'язовою та жировою).

Терагерцевий імпульс створюється, коли ультракороткий імпульс лазера(приклад, Ті – сапфір лазер),працюючий на довжині хвилі 800 нм та з частотою повторення 80 МГц, сфокусований на фотопровідниковий фемтосекундний перемикач з арсеніду галію (GaAs), або на так званий терагерцевий емітер. Коли з'являється імпульс ультракороткого лазера, генерується фотострум на перемикачі; швидкоплинний струм, який проходить через емітер створює умови для короткотривалого вибуху терагерцевого випромінювання. Система дзеркал фокусує терагерцеве випромінювання на досліджуваному зразку. Визначення Т – променів забезпечується шляхом використання оптичного напівпровідникового перемикача, схожий на випромінювач. Фемтосекундні інфрачервоні імпульси ближнього діапазону вмикають оптичний перемикач. Час затримки між терагерцевими та оптичними імпульсами змінюється, щоб виміряти наявність терагерцевого поля. Забезпечивши дані вимірювання перетворенням Фур'є, за рахунок аналізу хвиль, отримуємо частотну інформацію про досліджувальний об'єкт.

На рис.3 наведена схема запропонованого приладу.

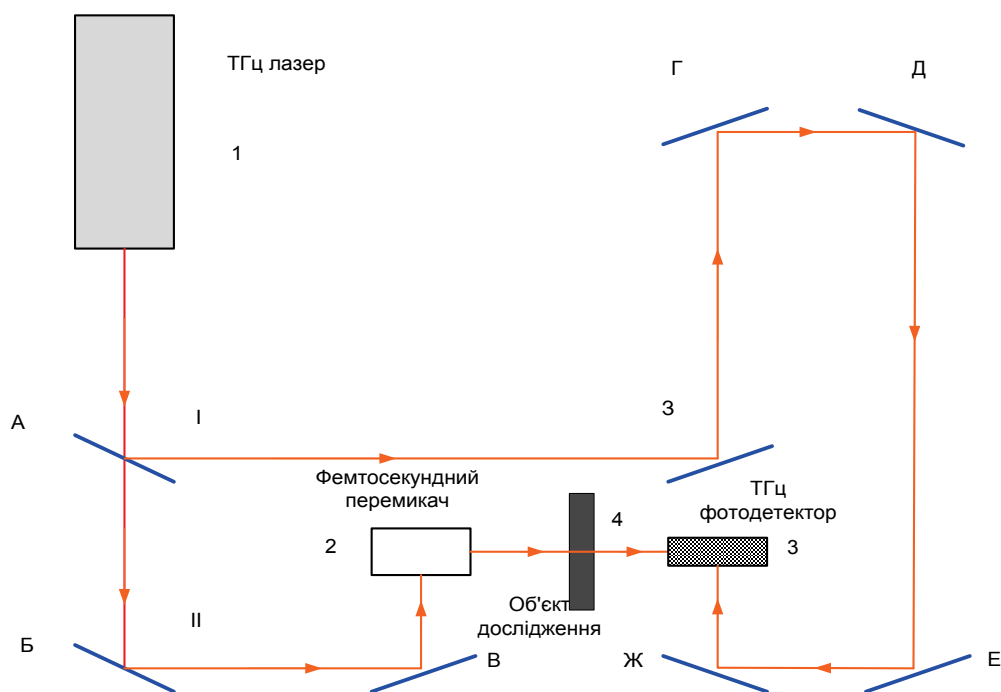


Рисунок 3. Схема ТГц – приладу для визначення статі та аномалій статевих хромосом:
 1 – ТГц – лазер; 2 – фемтосекундний перемикач; 3 – ТГц – фотодетектор; 4 – об'єкт дослідження;
 А – З – система дзеркал

ТГц – лазером 1 генерується високочастотне випромінювання, яке проходить через дохронне дзеркало А і розщеплюється на два пучки (I та II). Перший пучок йде через систему дзеркал А, З, Г, Д, Е, Ж та потрапляє безпосередньо на ТГц – фотодетектор 3. Другий пучок випромінювання, проходячи через систему дзеркал А, Б, В, потрапляє на фемтосекундний перемикач 2, далі, проходячи через об'єкт дослідження, потрапляє, також, на ТГц – фотодетектор.

Крім того, для даного приладу, передбачено встановлення всіх необхідних компонент (спеціальне дихронне дзеркало, фільтр збудження, запираючий фільтр) для FISH – діагностики. Це передбачає підвищення чіткості та якості зображення, деталізації об'єктів, визначення досить дрібних аномалій хромосом, ідентифікацію кожного сегменту хромосоми.

ВИСНОВОК

В даній роботі запропоновано новий метод визначення генетичної статі індивідуума за даними цитологічного дослідження за допомогою Т – променів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Teragerz Pulsed Spectroscopy as a new tool for measuring the structuring effect of solutes on water. N. Kaun, J.R. Baena, D.Newnham and B.Lendl * Institute of Chemical Technologies and Analitics, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9 –164 , 1060 Vienna, Austria (N.K., J.R.B., B.L.) and Tera View Limited, Platinum Building, St John’s Innivation Park, Cambridge CB4 0WS, UK (D.N.) APPLIED SPECTROSCOPY. Volume 59, Number 4, 2005.
2. Зерова-Любімова Т.Е., Горovenко Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини. Київська медична академія післядипломної освіти ім.Шупіка, 2003 рік.
3. Юров Ю.Б., Александров И.А., Миткевич С.П. и др. Молекулярные маркеры для гетерохроматиновых районов хромосом человека. Хромосомы человека в норме и при патологии, МОИП. М 1989; 63-73.
4. Многоцветие современной цитогенетики, или multicolor fish today. Статья 5: Информационный Вестник ВОГиС №11 1999 год.
5. Демидова И.А., Ворсанова С.Г. Цитологический и молекулярный полиморфизм гетерохроматиновых районов хромосом человека. Медицинская генетика (Экспресс-информация).М 1990; 12: 1-9.
6. Орехова В.А., Лашковская Т.А., Шейбак М.П. Медицинская генетика 3-е издание, Минск “Высшая школа”, 1999 г.
7. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека, 3 тома. Москва “Мир”, 1989 г.
8. Вельтищев Ю.Е., Ведуга О.Б., Ананенко А.А., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Генно-инженерные методы в диагностике наследственных болезней. Вопросы охраны матери и детей 1987; 32:41-46.
9. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Александров И.А. и др. Молекулярно-цитогенетическая диагностика наследственных болезней , связанных с различными аномалиями хромосомы X.Педиатрия 1989; 1:76-80.
10. Le Beau M. One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH. Nature Genetics 1996; 12: 341-347.
11. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Соловьев И.В., Демидова И.А., Шаронин В.О., Вехова Н.В., Берешева А.К. Современные достижения молекулярной цитогенетики в диагностике хромосомной патологии у детей. Российский вестник перинатологии и педиатрии, №1-1998, с.31-36.

Надійшла до редакції 10.09.2008р.

КОЖЕМ’ЯКО В.П. – академік АІНУ , д.т.н., професор, завідуючий кафедрою лазерної та оптоелектронної техніки, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна.

ШЛЬМАХ С.О. – лікар – стоматолог, інженер лазерної та оптоелектронної техніки.