Содержание.

Введение. 1

Глава 1. Митотические хромосомы. 2

Глава 2. Мейотические хромосомы. 5

Глава 3. Цитогенетический метод. 13

Глава 4. Половой хроматин. 20

Глава 5. Мозаицизм. 23

Введение.

Одним из ключевых вопросов генетики человека является вопрос о строении и функционировании материальных ос­нов наследственности. Сведения по каждому из трех уров­ней организации наследственных структур (генному, хро­мосомному, геномному) накапливаются в последние годы с удивительной быстротой, и можно надеяться, что недале­ко то время, когда будет составлена довольно цельная картина наследственности человека. Уже и сейчас по это­му вопросу человека можно отнести к числу наилучшим образом изученных объектов наряду с дрозофилой, мышью, кукурузой.[[1]](#footnote-1)

Для правильного понимания значения наследственно­сти в патологии человека необходимо иметь подробные сведения по трем частично взаимосвязанным разделам:

1) по морфологическому и химическому строению хромо­сом и кариотипа в целом; 2) по дискретным признакам человека, контролируемым единичными генами («инвента­ризация» единиц наследственной изменчивости); 3) по «ар­хитектонике» генов в хромосомах (сцепление генов и кар­ты хромосом). По каждому из этих разделов накоплено много данных, их интенсивная разработка продолжается как в теоретическом, так и прикладном (клиническом) ас­пектах.

Принципы и основные разделы общей цитогенетики сформировались в течение 20-х и 30-х годов в основном благодаря исследованиям, проведенным на дрозофиле и не­которых растениях. Цитогепетика человека и млекопитаю­щих, занимающая ведущее место в современой цитогенетике, развилась позже, главным образом в связи с методи­ческими трудностями.

Историю развития цитогенетики человека можно раз­делить на три периода. Первый охватывает период с прош­лого века до середины 50-х годов и имеет сейчас сугубо исторический интерес. Это были поиски методических под­ходов к получению препаратов хромосом человека заме­чательными своей настойчивостью и трудолюбием цитологами того времени (А. Г. Андрес, 1934). Хотя нашими цитогенетиками А. Г. Андресом и М. С. Навашиным были правильно описаны первые 10 пар крупных хромосом, од­нако не было достоверно установлено даже общее число хромосом в клетках человека. Неизвестной оставалась так­же их морфология.

Второй период, начало которому было положено рабо­той Tjio и Levan в 1956 г., характеризовался возникнове­нием и бурным развитием современной цитогенетики чело­века. Довольно быстро были разработаны все основные ме­тодические приемы хромосомного анализа, получены фун­даментальные сведения о кариотипе человека, об основных особенностях строения и функционирования его нормаль­ных хромосом. Именно в этот период зародилась медицин­ская цитогенетика, которая открыла новую область пато­логии человека, обусловленную изменением числа или структуры хромосом.

Третий период развития цитогенетики человека начался в 70-х годах. Его по праву можно считать началом совре­менного этапа в развитии науки о цитологических основах наследственности человека. Ряд методических нововведе­ний обеспечили переход цитогенетики на качественно иной уровень. Реализовалась возможность изучения индивиду­альности хромосом человека и даже их участков. Это сра­зу подняло на новый уровень медицинскую цитогенетику. Стало возможным исследовать комплексно морфологию, функцию, химические особенности строения и надмолеку-лярную организацию хромосом человека. Развитие в эти же годы методов генетического картирования хромосом че­ловека обеспечило решение самой сложной задачи — соз­дание генетических карт хромосом.

Таким образом, современная цитогенетика человека представляет собой богатую фактическим материалом, раз­ветвленную самостоятельную область генетики человека. В настоящее время задача идентификации всех элемен­тов человеческого кариотипа при анализе на стадии мито­за решена на основе применения дифференциальных ок­расок хромосом.

Хромосомы как индивидуаль­ные структуры становятся доступными для исследова­ния после значительного уко­рочения и утолщения, кото­рые они испытывают в период подготовки клетки к деле­нию. Для соматических клеток таким делением является митоз, для генеративных — сначала митоз, а затем мейоз.

### Глава 1. Митотические хромосомы.

Основные сведения о хромо­сомном наборе человека в целом и об индивидуальных хромосомах получены в результате изучения хромосом в метафазе митоза. На этой стадии митоза отчетливо видно, что диплоидный набор хромосом человека состоит из 46 элементов: 22 пар аутосом и одной пары половых хромо­сом (XX у женщин и XY у мужчин). На стандартно окрашенных препаратах форма метафазных хромосом оп­ределяется местоположением первичной перетяжки, кото­рая формируется благодаря деконденсации функционирую­щего в метафазе центромерного района. В отдельных хро­мосомах могут существовать дополнительные перетяжки, называемые вторичными. В случае локализации такой перетяжки на конце хромосомы отделяемый ею дистальный участок хромосомы называется спутником.

По форме и общим размерам все аутосомы человека лег­ко подразделяются на 7 групп, обозначаемых латинскими буквами от А до G (рис. 8). Помимо этого, все аутосомы в порядке уменьшения общей длины нумеруются (от 1 до 22).

Длина одной и той же хромосомы в митозе значительно варьирует, поскольку и в стадии метафазы продолжается процесс естественной конденсации хромосомы, который значительно усиливается колхицином. Поэтому для идентификации служит показатель относительной, а не абсолют­ной длины хромосомы. Однако его надежность ограничива­ется тем, что хромосомы обладают разной длиной, а в дан­ной хромосоме плечи разных размеров сокращаются неодинаково: укорочение более длинных происходит быст­рее по сравнению с короткими. Это не отражается на ука­занной выше групповой характеристике, но препятствует идентификации близких по размеру и форме хромосом внутри групп. Затруднения в индивидуальной идентифика­ции хромосом усиливаются также тем, что дифференциаль­ная конденсация может иметь место и между гомологичными хромосомами, обусловливая гетероморфизм гомоло­гов. В настоящее время потребность в использовании метода морфометрии и определяемых с ее помощью линей­ных параметров хромосомы фактически отпала в связи с введением в практику хромосомного анализа дифференци­альных окрасок хромосом.[[2]](#footnote-2)

Анализ спонтанных вторичных перетяжек, включая спутничные, заметно не облегчает распознавание отдель­ных хромосом. С их помощью наиболее регулярно можно выделить аутосому 9, часто обладающую значительной пе­ретяжкой в околоцентромерном районе длинного плеча. Спутничной перетяжкой обладают все десять акроцентрических хромосом человека, a D- или G-хромосомы по это­му признаку в пределах групп не различаются.

Морфологическая однородность хромосомы по длине, как она вырисовывается при микроскопическом изучении метафазных хромосом на рутинно приготовленных и ок­рашенных препаратах, на самом деле оказывается обман­чивой. Методический прогресс в цитогенетике человека и высших эукариотов в целом, который имел место на про­тяжении последних 15—20 лет, привел к открытию глубо­кой линейной дифференцированности хромо­сомы в отношении и структуры, и функции. Эта дифференцированность, индивидуальная для каждой хромосомы, сравнительно легко выявляется в метафазе митоза. Бла­годаря этому в современной цитогенетике человека можно идентифицировать все хромосомы не по отдельным и слу­чайным признакам, а по существенным сторонам их струк­турно-функциональной организации. В практике цитогенетического анализа с этой целью .исследуют дифференци­альную конденсацию хромосом, хронологию репликации ДНК в хромосомах или дифференциальную окрашиваемость хромосом (А. Ф. Захаров, 1977).

Дифференциальность конденсации участ­ков хромосомы — одна из существенных ее характеристик, наиболее полно выраженная в интерфазном ядре. В естественных условиях течения митоза хромосомные участки, резко различающиеся по степени конденсации в период интерфазы, в метафазе выглядят практически оди­наково. Лишь при специальных способах световой или электронной микроскопии удается обнаружить неоднород­ную линейную структуру внешне гомогенной метафазной

хромосомы (Bahr, Larsen, 1974). Выравнивание циклов конденсации в разных участках хромосом можно затормо­зить искусственно. С этой целью особенно успешно при­меняется 5-бромдезоксиуридин (А. Ф. Захаров, 1973, 1977;

Dutrillaux, Lejeune, 1975). В присутствии этого вещества хромосомы вступают в метафазу неравномерно уплотнен­ными по своей длине. В результате тщательного изучения их морфологии показано, что каждая хромосома человека имеет строго постоянное и специфическое чередование нор­мально и слабо конденсированных участков и по этому признаку может быть идентифицирована.

Внутрихромосомная асинхронность реплика­ции ДНК является второй важнейшей чертой линейной неоднородности хромосомы, которая может быть выявлена в метафазе митоза. В течение полутора десятков лет эта черта хромосомной организации была доступна изучению методом радиоавтографии хромосом (под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской, 1969; А. Ф. Захаров, 1977; Giannelli, 1970, 1974). На основе этого метода были вскрыты прин­ципиальные закономерности репродукции хромосом чело­века, среди которых асинхронность репродукции разных участков хромосомы, постоянство и специфичность поряд­ка репродукции для данной хромосомы являются важней­шими. Однако идентификацию индивидуальных хромосом радиоавтография продвинула меньше, чем этого ожидали. На радиоавтографах дополнительно удается различить аутосомы 4 и 5, 13, 14 и 15, 17 и 18. В женских клетках одна из двух Х-хромосом отличается поздним началом и поздним окончанием синтеза ДНК. Несмотря на ограни­ченность данных, получаемых методом радиоавтографии, этот прием оказался исключительно полезным в улучше­нии идентификации аномалий указанных хромосом и по­мог в выделении нескольких новых самостоятельных синд­ромов в хромосомной патологии.

Существенный прогресс в изучении последовательности синтеза ДНК по длине каждой хромосомы человека в нор­ме, ее взаимосвязи с другими характеристиками хромосом­ной организации, ее состояния в случаях численных или структурных изменений в хромосомном наборе происхо­дит в настоящее время благодаря использованию в качест­ве предшественника синтеза ДНК аналога тимидина — 5-бромдезоксиуридина. Ослабленная способность к окрашиванию участков хромосомы, включивших этот предшест­венник, вооружила цитогенетиков точным методом изуче­ния хронологии хромосомной репродукции, возможности которого лимитируются лишь разрешающей способностью световой микроскопии. Репликационная структура всех хромосом человека выявляется с предельной ясностью, и она может быть описана в четких морфологических терми­нах.

Каждая хромосома состоит из участков, реплицирующихся в разное время. Имеется четкое чередование районов с ранней и поздней репликацией. В метафазной хромосоме

такие участки хорошо различимы с помощью светового ми­кроскопа. Специфичность репликационной структуры каж­дой хромосомы складывается из индивидуальности разме­ров, числа и взаимного расположения различающихся хро­мосомных районов (рис. 9).

В отличие от изложенных выше двух феноменов нерав­номерного окрашивания хромосом по длине, вызванного включением в ДНК 5-бромдезоксиуридина, под диф­ференциальной окрашиваемостью хромо­сом подразумевается способность к избирательному окра­шиванию по длине хромосомы, не модифицированной прижизненно какими-либо воз­действиями. Дифференциаль­ное окрашивание хромосом в этом случае обеспечивается сравнительно простыми температурно-солевыми воздей­ствиями на фиксированную хромосому.

Важно отметить, что при всем разнообразии подобных обработок хромосомных пре­паратов после фиксации и применяемых флуорохромных или нефлуоресцирующих красителей выявляемая ли­нейная неоднородность хро­мосомы всегда одна и та же. Ее рисунок меняется только в зависимости от степени уп­лотненности хромосомы: в бо­лее длинных, слабее сокра­щенных хромосомах стано­вится заметной дальнейшая неоднородность тех сегмен­тов, которые выглядели гомо­генно окрашенными в силь­но конденсированных хромо­сомах. Дифференциальное ок­рашивание может наблюдать­ся либо по всей длине хромо­сомы (Q-, G- и R-сегменты), либо в ее центромерном рай­оне (С-сегменты).

Наиболее ясное представле­ние о рисунке дифференци­ального окрашивания хромо­сом по всей длине можно получить при окраске препаратов по G-методике, используя краситель Гимзы (рис. 10). На таких препаратах хромосомы выглядят поперечно исчер­ченными, по-разному окрашенными сегментами («ban­ding»). Рисунок каждой пары хромосом является специ­фичным для нее. Размеры сегментов неодинаковые. В мел­ких хромосомах групп F и G рисунок образуется единич­ными сегментами, в крупных хромосомах их много. Общее количество окрашенных и неокрашенных сегментов в нор­мальном хромосомном наборе средней степени конденса­ции, в соответствии с Парижской номенклатурой, равно 322. В прометафазных хромосомах их число увеличива­ется до 1000 и более.

На Парижской конференции по номенклатуре в цитогенетике человека была разработана и в настоящее время вошла в практику цитогенетического анализа система обо­значения сегментов нормальных хромосом и хромосом, подвергшихся тем или иным структурным перестройкам (Paris Conference, 1971). На рис. 11 приведен пример этой системы для аутосомы 1.

Независимо от того, как решается вопрос о природе диф­ференциальной окрашиваемости хромосом, основанные на этом феномене цитологические карты имеют исключитель­ное значение для развития цитогенетики человека. С их помощью удается отнести генетические маркеры не просто к тому или иному хромосомному плечу, а к определенному району хромосомы. В медицинской цитогенетике стало реальным выявление происхождения аномальных хромо­сом вплоть до точного описания районов.

Второй вид дифференциального окрашивания хромосом вскрывает специфичность околоцентромерных районов в хромосомах человека. В разных хромосомах размеры С-сегментов разные, они особенно велики в аутосомах 1, 9 и 16. Однако идентифицировать по этой окраске сходные по величине и форме хромосомы не удается. В Y-хромосоме С-хроматин локализуется в дистальной части длинного плеча. В одной и той же хромосоме у разных индивидов его содержание может различаться.

### Глава 2. Мейотические хромосомы.

Мейоз объединяет серию раз­личных процессов, в ходе которых первичные зародыше­вые клетки дифференцируются в зрелые половые клетки. В начале этой серии сперматогонии (оогонии) превраща­ются в первичные сперматоциты (ооциты). Центральным событием является первое мейотическое деление сперматоцита (ооцита), в ходе которого хромосомы испытывают особенно сложные специфические преобразования в пери­од профазы. Первая мейотическая профаза разделяется, как известно, на пять стадий: лептотену, зиготену, пахитену, диплотену и диакинез. В отличие от митоза, профаза которого в цитогенетическом анализе практически не ис­пользуется, профазные хромосомы первого мейотического деления представляют очень большой интерес для цитоге-нетики человека. Метафазные хромосомы первого мейоти­ческого деления, являющиеся бивалентами гомологичных хромосом, представляют собой менее дифференцированные структуры по сравнению с метафазными митотическими хромосомами. Хромосомы второго мейотического деления почти не используются в цитогенетике человека.

Протекание мейоза в мужском и женском организме значительно различается в нескольких отношениях: пери­од онтогенеза, продолжительность отдельных фаз, морфоло­гия митотических преобразований.

У мужчин мейотические деления начинаются в пери­од полового созревания и протекают непрерывно на про­тяжении всего последующего половозрелого состояния. Этот процесс в отличие от женского мейоза не носит ци­клического характера. В семенниках одновременно созрева­ет большое количество гамет, поэтому гонады половозрело­го мужчины могут служить источником мейотически деля­щихся клеток в любой момент. На хромосомных препаратах одновременно удается видеть различные мейо­тические фигуры, от сперматогониальных метафаз до ме-тафаз второго мейотического деления. Продолжительность преобразований от сперматогоний до сперматозоидов зани­мает около 8—9 нед. Длительность отдельных стадий весь­ма различна, поэтому клетки разных стадий встречаются с неодинаковой частотой. Наиболее важные для цитогене-тического анализа стадии пахитены и диакинеза обычно представлены достаточным числом клеток.[[3]](#footnote-3)

В женском организме мейоз протекает в два этапа, раз­деленных большим промежутком времени. Первый этап, включающий формирование оогоний и прохождение пер­вого мейотического деления, проходит в эмбриональных яичниках. К моменту рождения девочки в яичниках все оогоний дифференцированы в ооциты, а последние прошли стадии лептотены — пахитены и остановились в стадии диплотены. Пребывание в этой стадии, получившей назва­ние диктиотены, продолжается весь постнатальный период жизни женщины. Последующее развитие клетки из ста­дии диктиотены в зрелую яйцеклетку происходит цикли­чески, по одной клетке ежемесячно, и заканчивается ову­ляцией. Изложенное объясняет, почему ранние стадии пер­вого мейотического деления у женщины можно анализиро­вать лишь в раннем эмбриональном периоде, а последую­щие стадии в обычных условиях изучению недоступны.

Основные сведения по организации мейотических хромосом человека получены при изучении клеток семен­ников. Можно выделить следующие аспекты этих исследо­ваний.

*Анализ линейной структуры индивидуальных хромосом.* Характерной особенностью структуры мейотических хро­мосом, выраженной преимущественно на первых стадиях профазы мейоза, является их хромомерное строение (рис. 12). Из данных по цитологии мейотических хромо­сом некоторых видов растений хорошо известна индивиду­альность хромомерного строения каждой хромосомы («Ци­тология и генетика мейоза» В. В. Хвостовой и Ю. В. Богда­нова, 1975). К сожалению, индивидуальные биваленты в хромосомном наборе человека, как мужском, так и жен­ском, можно выделить лишь в поздней пахитене, когда они значительно сокращены и хромомерность их строения су­щественно утрачена. Тем не менее в результате несколь­ких попыток пахитенного анализа хромосом получены пер­вые сведения о морфологии бивалентов акроцентрических и некоторых других хромосом (под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской, 1969; Hungeriord, 1973).

В идентификации пахитенных бивалентов с определен­ным успехом применены С- и Q-методы дифференциаль­ной окраски (Goetz, 1975). Обнаружено полное совпадение между рисунками G-окрашивания и хромомерным строе­нием пахитенных хромосом, а также между рисунками ок­рашенных по G-методу мейотических и митотических хро­мосом (Luciani e. a., 1975).

*Хромосомная конъюгация и образование хиазм.* Иссле­дование диакинеза — метафазы I мейоза в клетках муж­чин показало, что гомологичная конъюгация является обя­зательной для всех хромосом человека, включая короткие. В том или ином биваленте имеется от 1 до 6 хиазм; по данным разных авторов, их общее число на хромосомный набор колеблется от 35 до 66 (Ford, 1973). Распределение хиазм в индивидуальных бивалентах стало возможным анализировать после того, как каждый бивалент удалось идентифицировать на основе последовательной окраски по Q- и С-технике (Hulten, 1974). По данным Hulten (1974), средняя частота хиазм в индивидуальных аутосомах про­порциональна длине хромосомы. На нее не влияют числен­ные или структурные нарушения в других хромосомах. По-видимому, хиазмы формируются в определенных райо­нах каждой хромосомы. Выяснение числа и локализации хиазм в каждой хромосоме имеет важное значение при их генетическом картировании.

*Идентификация хромосомных аномалий.* Явление конъ­югации гомологичных хромосом в мейозе используется для индентификации многих хромосомных перестроек, за­трагивающих линейную структуру хромосомы. Делеции, вставки, инверсии, реципрокные транслокации, дуплика-ции приводят к изменению конфигурации бивалента. Воз­никают униваленты, триваленты и т. д. В сочетании с анализом митотических хромосом исследование морфоло­гии мейотических хромосом в пахитене, диакинезе и мета-фазе I неоднократно проводилось в случаях численных или структурных изменений аутосом, половых хромосом у мужчин с бесплодием (А. А. Прокофьева-Бельговская и В. К. Борджадзе, 1971; Kjessler, 1966; Hulten, 1974, и др.). Субмикроскопическая или надмолекулярная организация хромосомного аппарата изучена совершенно недоста­точно. Если о строении хромосомы на уровне световой микроскопии и о молекулярном строении наследственно­го материала в настоящее время накоплена обширная информация, то промежуточные ступени ультраструктур­ной организации хромосомы остаются в основном неиз­вестными. Нет пока никаких фактических предпосылок ставить вопрос о возможной специфике ультраструктур­ной организации генетического аппарата человека.

Наиболее ценную информацию о тонкой структуре функционирующих хромосом принесло исследование политенных хромосом, которые являются специфической, но естественной моделью хромосом интерфазного ядра в клетках двукрылых, и хромосом типа «ламповых щеток», обнаруживающихся в ооцитах амфибий в мейотической профазе I. Большие размеры этих хромосом позволили провести тщательное их изучение под световым микро­скопом. В результате этих исследований сформулирова­ны положения, которые рассматриваются как принципи­альные для организации хромосом эукариотов в целом (И. И. Кикнадзе, 1972).

В интерфазном ядре хромосомные районы, соответст­вующие эухроматину, имеют хромомерное строение. Каждая хромомера является структурной и функциональ­ной единицей хромосомы как продольно дифференциро­ванной органеллы. Дифференциальная транскрипция этих единиц структурно обеспечивается деконденсацией упако­ванного в ней дезоксирибонуклеопротеида, что выражается в форме пуфов в политенных хромосомах, или петель в хромосомах типа «ламповых щеток».

Методом исследования тонкой структуры интерфазных ядер, не обладающих политенными хромосомами, а также метафазных хромосом является электронная микроскопия (Ю. С. Ченцов, В. Ю. Поляков, 1974). К сожалению, на ос­новании результатов, полученных этим методом, пока не удалось составить цельного представления об ультраструк­туре интерфазного ядра. На электронограммах ультратон­ких срезов основная обнаруживаемая морфологическая единица — это нить в разных сечениях диаметром 10 нм и меньше. На препаратах хроматина, распластываемого на поверхности водного мениска, обнаруживаются протяжен­ные нити около 23—25 нм в диаметре.

Несмотря на многочисленные исследования митотических или мейотических хромосом, данные по их ультра­структуре, которые позволили бы создать непротиворечи­вую модель упаковки элементарной хромосомной нити во время клеточного деления, остаются скудными. Наиболь­шая информация получена по ультраструктуре специали­зированных районов хромосом: центромерного района, ядрышка, синаптонемального комплекса в мейотическпх хромосомах. Данные электронной микроскопии целых изо­лированных хромосом использованы для их идентифика­ции, при этом специальное внимание уделено метафазным хромосомам человека (Bahr, Larsen, 1974). Этот метод по­зволил обнаружить неравномерную плотность упаковки элементарных хромосомных нитей по длине хромосом, и рисунок этой неравномерности оказался совпадающим с линейной дифференцированностыо структуры хромосомы, выявляемой под световым микроскопом. Элементарные фибриллы на электронограммах целых распластанных хро­мосом имеют размер порядка 25—30 нм. Биохимическое исследование таких фибрилл и соответствующие расчеты дают основание заключить, что молекулы нуклеопротеидов находятся в них в сверхскрученном состоянии и что, кро­ме гистонов, фибриллы содержат другие белки.

Достаточно полное освещение вопросов молекулярной генетики и хромосомной организации в многочисленных специальных монографиях и руководствах (С. Е. Бреслер, 1973; И. П. Ашмарин, 1974; Г. Стент, 1974, и др.) исклю­чают необходимость подробного рассмотрения этих вопро­сов в данной книге. Сравнительно новый молекуляр­ный аспект хромосомной организации воз­ник в связи с разработкой методов фракционирования тотальной ДНК генома по повторяемости сходных нуклеотидных последовательностей и методов гибридизации ну­клеиновых кислот на хромосомных препаратах. Эти ме­тоды открыли возможность выяснения локализации раз­ных фракций ДНК в хромосомном наборе. Важными находками, полученными в этой новой области, погранич­ной между молекулярной и цитологической генетикой, бы­ли: а) обнаружение в геноме эукариотов, помимо ДНК с уникальными последовательностями, большой доли ДНК с одинаковыми или близкими последовательностями нуклеотидов, повторяющимися многие сотни и тысячи раз (Г. П. Георгиев, 1973; С. А. Лимборская, 1975); б) обнару­жение неравномерной локализации ДНК с разными харак­теристиками в хромосомном наборе: ДНК с наибольшим числом повторяющихся последовательностей локализуется в гетерохроматиновых районах хромосом.

К настоящему времени фракционирование ДНК и опре­деление хромосомной локализации фракций проведено на многих видах организмов. Каждый вид характеризуется своей специфической структурой генома в отношении со­става ДНК и спецификой их распределения по хромосо­мам набора. Многие работы этого направления выполнены на клетках человека. Полученные в них результаты по­дытожены А. Ф. Захаровым (1977) и Jones (1973).

ДНК генома человека может быть фракционирована на ДНК с уникальными копиями (около 64%) и ДНК с пов­торяющимися последовательностями. По скорости ренатурации, которая отражает повторяемость нуклеотидных по­следовательностей, последняя фракция может быть под­разделена на ДНК с малой (13,4%), промежуточной (12,3%) и высокой (10,3%) скоростью ренатурации моле­кул ДНК. Таким образом, в геноме человека около 10% всей ДНК имеет высокую многократность повторения оди­наковых последовательностей.

Методом градиентного ультрацентрифугирования в группе ДНК с высокой повторяемостью последовательно­стей выделены по крайней мере четыре типа так называе­мых сателлитных ДНК. Помимо этих видов ДНК, в экс­периментах с гибридизацией ДНК — РНК исследована хромосомная локализация ДНК, кодирующая синтез 5S, 18S и 28S рибосомных РНК. В настоящее время распре­деление разных типов ДНК в хромосомах человека выри­совывается следующим образом.

ДНК с низкой и промежуточной повторяемостью нуклеотидных копий обнаруживается во всех хромосомах, причем она локализуется по всей длине их плеч.

ДНК с высокой повторяемостью нуклеотидных копий обнаруживается преимущественно в околоцентромерных и отчасти теломерных районах. Сателлитные индивидуаль­ные ДНК распределены в разных хромосомах неравномер­но. Так, сателлитной ДНК I и IV особенно богата Y-xpoмосома, в хромосомах 1 и 16 больше всего содержится сателлитной ДНК II, а в хромосоме 9 — III. Рибосомная ДНК 18S и 28S заключена почти исключительно в корот­ких плечах всех 10 акроцентрических хромосом. Дистальная часть длинного плеча аутосомы 1 — преимущественное место для пистронов, кодирующих 5S РНК. Не исключена возможность, что методом гибридизации ДНК с РНК in situ удастся картировать не только полигенные ло-кусы, но также структурные гены, повторяющиеся малое число раз (Rotterdam. Conference, 1974).

Две важнейшие черты генетической организации эукариотов - дифференциальная активность структурных ге­нов и большая доля генов, регулирующих этот процесс,— должны иметь основой соответствующую структурную ор­ганизацию хромосомы. Десятилетия упорного труда цитогенетиков значительно приблизили нас сегодня к понима­нию того, как в хромосоме взаимодействуют структура и функция, как хромосома осуществляет свою сложную роль интеграции системы генов.

Первая фундаментальная черта структурно-функцио­нальной организации хромосомы состоит в существовании двух разных функциональных типов хромосомного мате­риала — эухроматина и гетерохроматина.Их основное раз­личие заключается в транскрипционной активности.

Отсутствие генетической активности у гетерохроматина обусловлено либо его бедностью структурными генами (структурный гетерохроматин), либо временным выклю­чением участка хромосомы, несущего такие гены, из гене­тической транскрипции (факультативный гетерохроматин, гетерохроматинизация).

Второй важнейшей чертой хромосомной организации яв­ляется линейная расчлененность хромосомы па участки, состоящие из хроматина разного типа. Каждая хромосо­ма отличается своим уникальным порядком расположения гетеро- и эухроматиновых районов.

Подразделенность хроматина по генетическому значе­нию хорошо коррелирует с различием типов хроматина и по ряду других характеристик: состоянию конденсации в интерфазном ядре и хронологии конденсации в митотическом и мейотическом цикле; времени репликации ДНК;

отношению к окраске флуорохромами или нефлуоресци­рующими красителями; чувствительности к повреждающе­му действию химических мутагенов; химическим особен­ностям ДНК и, по-видимому, белков, входящих в состав хроматина; фенотипическим проявлениям хромосомных перестроек. Для гетерохроматина характерны конденсиро­ванное состояние в интерфазном ядре, опережающая кон­денсация в профазе митоза и мейоза, возможность отста­вать в конденсации спонтанно или под влиянием некото­рых воздействий в метафазе митоза. По сравнению с эухроматином гетерохроматиновые районы хромосом ре­продуцируются в более поздние отрезки S-периода. При дифференциальной окраске по G- и С-методике гетерохро­матиновые сегменты сохраняют способность к окрашива­нию (G-сегменты) и даже усиленно красятся (С-сегменты). В цитогенетике хорошо известна неравномерность распределения по длине хромосомы ее структурных по­вреждений, индуцируемых мутагенными веществами: по­вышенной повреждаемостью отличаются именно гетеро­хроматиновые районы. ДНК с неоднократно повторяющи­мися нуклеотидными последовательностями характерна именно для гетерохроматина. В отличие от эухроматина, содержащего уникальные гены, дисбаланс по которым от­рицательно отражается на фенотипе организма, изменения в количестве гетерохроматина не влияют или значительно меньше влияют на развитие признаков организма.

Взаимосвязанность различных структурных и функцио­нальных характеристик хромосомы — третья фундамен­тальная черта хромосомной организации. Вопрос о причин­но-следственных связях в отмеченном корреляционном комплексе активно исследуется. Ответ должен быть полу­чен, в частности, на вопрос о том, сводимо ли все разнообра­зие свойств разных видов хроматина к различиям в химиче­ских особенностях хромосомной ДНК. Однако независимо от прогресса в понимании этих корреляций их феномено­логия служит главным инструментом к познанию струк­турно-функциональной расчлененности каждой конкрет­ной хромосомы человека. В продольной дифференцирован­ности индвидуальных хромосом по плотности конденсации, по окрашиваемости теми или иными красителями, по осо­бенностям составляющей их ДНК и другим характери­стикам заложены не формальные признаки идентифика­ции хромосом или их участков, а признаки, имеющие ге­нетический смысл. Эта новая область цитогенетики чело­века активно развивается, и в сочетании с успехами в картировании хромосом поднимет цитогенетику человека на еще более высокий уровень. Из уже имеющихся по этой проблеме сведений интерес для генетики представля­ют следующие.

Гетерохроматин, окрашивающийся по методике С-окраски, обнаруживается во всех хромосомах человека и на­зывается структурным гетерохроматином. Во всех аутосомах и Х-хромосоме он занимает, как в большинстве хромосом других биологических видов, околоцентромерный район. В Y-хромосоме он локализуется в дистальной части длинного плеча. В разных хромосо­мах количество С-гетерохроматина разное. Особенно круп­ные его блоки, распространяющиеся преимущественно на длинные плечи, содержатся в аутосомах 1, 9 и 16; именно эти районы известны в качестве наиболее регулярных вторичных перетяжек. Особенно мелкие блоки этого хро­матина наблюдаются в аутосоме 2 и в Х-хромосоме. В акроцентрических хромосомах гетерохроматин распростра­няется на короткие плечи.

По-видимому, в разных хромосомах околоцентромерный гетерохроматин неодинаков, что следует из ряда фактов. Эта разнородность обнаруживается уже по разному опти­муму времени и рН щелочного диапазона, применяюще­гося в технике С-окраски, при которых С-хроматин появ­ляется в разных хромосомах. Неоднородность особенно демонстративна при окрашивании хромосом акрихином или акрихин-ипритом: С-гетерохроматин аутосом 1, 9 и 16 совершенно не флуоресцирует, а гетерохроматин аутосом 3, 4, акроцентрических хромосом и Y-хромосомы светится чрезвычайно ярко. Генетическое значение разнородности С-гетерохроматина человека пока не ясно. Химическая основа этой разнородности начинает проясняться. Экспе­риментами с гибридизацией ДНК с РНК на цитологиче­ских препаратах установлено, что различия гетерохроматина разных хромосом человека могут быть связаны с особенностями структуры ДНК. Во всех случаях это ДНК с повторяющимися нуклеотидными последовательностями, однако в разных хромосомах содержатся, по-видимому, разные классы ДНК. Так, из хорошо охарактеризованных сателлитных ДНК сателлиты I и IV в большом количестве содержатся в Y-хромосоме, сателлит II — в гетерохроматине аутосомы 1 и 16, сателлит III — в гетерохроматине аутосомы 9. Структурный гетерохроматин акроцентриче­ских хромосом — основной носитель рибосомной ДНК.

В полном соответствии с данными общей цитогенетики о слабом отрицательном влиянии дисбаланса по гетерохроматиновому материалу на развитие организма находятся сведения о существовании в человеческой популяции зна­чительного полиморфизма, обусловленного размерами околоцентромерного гетерохроматина. Особенно сильно варьи­рует содержание структурного гетерохроматина С-типа в аутосомах 1, 4, 9, 13—15, 16, 21—22 и Y-хромосоме. От­сутствие фенотипических отклонений от нормы у боль­шинства носителей таких кариотипических вариантов по­зволяет рассматривать их как варианты нормы. Однако эта проблема поставлена на повестку дня совсем недавно. Она требует тщательных исследований на большом популяционном материале, прежде чем будут намечены обоснован­ные границы хромосомной нормы, за пределами которой для организма становится не безразличным дисбаланс и по гетерохроматину.

Есть много оснований рассматривать хромосомные рай­оны, положительно окрашивающиеся по G-методике, как разновидность структурного гетерохроматина. В пользу этого представления, помимо отношения к красителям, свидетельствуют поздняя репликация этих районов, обра­зование ими хромомер в профазных мейотических хромо­сомах, способность отставать в митотической конденсации под влиянием 5-бромдезоксиуридина или холода. Важно отметить, что дисбаланс по аутосомам, особенно богатым G-окрашивающимся хроматином, влечет за собой возник­новение наименее тяжелых аномалий развития для инди­вида — носителя такого дисбаланса. Так, именно к этой категории хромосомных аномалий относятся трисомии 13, 18 и 21. Имеются сообщения и о том, что ДНК со средней повторяемостью одинаковых нуклеотидных последователь­ностей локализуется в G-окрашивающихся сегментах хро­мосом.

Вопросы, которые стоят перед цитогенетикой человека в отношении структуры, локализации и особенно генети­ческого значения структурного гетерохроматина, сравни­тельно новые.

Прогресс в их разрешении нельзя отделить от прогрес­са в расшифровке природы гетерохроматина у эукариотов в целом.

Помимо структурного гетерохроматина, существует ф а-культативный гетерохроматин, появление ко­торого в хромосоме обусловлено гетерохроматинизацией эухроматических районов при особых условиях. Имеются достоверные доказательства существования этого явления в хромосомах человека на примере генетической инактивации одной из Х-хромосом в соматических клетках жен­щины. У человека и других млекопитающих это частный случай явления, впервые открытого на дрозофиле Muller в 1932 г. и получившего название «компенсации дозы ге­на». Для млекопитающих его сущность состоит в эволюционно сформировавшемся механизме инактивации второй дозы генов, локализованных в Х-хромосоме, благодаря че­му, несмотря на неодинаковое число Х-хромосом, мужской и женский организмы по количеству функционирующих генов уравнены.

Сформулированная Lyon (1961, 1974) соответствую­щая гипотеза, получившая ее имя, состоит из трех основ­ных положений:

1. В соматических клетках нормального женского орга­низма одна из двух Х-хромосом инактивирована.

2. В разных клетках организма инактивируется или ма­теринская, или отцовская Х-хромосома.

3. Инактивация происходит в раннем эмбриональном периоде и стойко сохраняется за данной Х-хромосомой в клеточных поколениях.

Гипотеза Lyon основана на большом числе генетических и цитологических фактов, в том числе полученных на че­ловеке, которые за годы с момента ее выдвижения непре­рывно пополнялись и сведения о которых можно найти в ряде обзоров (А. Ф. Захаров, 1968; Lyon, 1972, 1974; Ghan-dra, Brown, 1975, и др.).

Генетические факты основаны на том, что у гетерозигот по сцепленным с Х-хромосомой признакам обнаружи­ваются две клеточные популяции. В одной из них прояв­ляется действие гена материнской Х-хромосомы, в дру­гой — отцовской, что связано с инактивацией отцовского или материнского аллелей соответственно. При формули­ровании своей гипотезы Lyon опиралась на случаи мозаич­ной окраски шерстного покрова мышей, что обусловлива­лось инактивацией в разных участках тела либо дикого гена, либо его мутантного аллеля. У человека обстоятель­ные доказательства существования в организме гетерозиготных женщин двух популяций клеток, в каждой из кото­рых инактивирован один из двух аллелей гена, локализо­ванного в Х-хромосоме, получены при изучении эффектов генов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фосфоглицераткиназы, гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы, эритроци-тарной группы крови Xg (а), при изучении сцепленных с Х-хромосомой агаммаглобулинемии и мукополисахаридоза (синдром Хантера), гемофилии. У гетерозигот по электро-форетическим вариантам глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы подтверждено, что у человека Х-хромосома инактивирует­ся в раннем эмбриональном периоде (Migeon, Kennedy, 1975). Эти выводы необходимо иметь в виду при интерпре­тации данных по наследственным болезням, сцепленным с Х-хромосомой, особенно у монозиготных близнецов.

Цитологические доказательства в пользу гипотезы Lyon также весьма убедительны и состоят в том, что в нормаль­ных женских соматических клетках одна из двух Х-хромосом отвечает характеристикам гетерохроматинизированной хромосомы. В интерфазном ядре она обнаруживается в виде так называемого тельца Барра (Х-хроматина) — плотно конденсированной, интенсивно окрашивающейся глыбки хроматина. В профазе эта хромосома опережает в цикле конденсации своего гомолога — вторую Х-хромосому. В условиях экспериментального воздействия холодом или 5-бромдезоксиуридином одна из Х-хромосом значительно отстает в конденсации, не отличаясь в этом отноше­нии от структурного гетерохроматина аутосом 1, 9, 16 и Y-хромосомы. Вторая Х-хромосома является одной из наи­более запаздывающих по началу и окончанию репликации ДНК.

Исследование многочисленных случаев аномалий в си­стеме Х-хромосом у человека показывает, что явление ком­пенсации дозы генов распространяется также на все слу­чаи нарушений в числе Х-хромосом, оставляя в соматиче­ской клетке лишь одну Х-хромосому в активном состоянии. Особенно демонстративны в этом отношении Х-полисомии, когда число инактивированных Х-хромосом равно числу имеющихся в клетке за вычетом одной генетически функ­ционирующей.

Как было показано выше, сведения о кариотипе чело­века постоянно углубляются, и исследования все больше Проводятся на молекулярном уровне. Цитологическое изу­чение материальных основ наследственности человека хо­рошо дополняется генетическим анализом дискретных признаков.

### Глава 3. Цитогенетический метод.

В генетике человека используются разнообразные методы иссле­дования, применяемые и в других разделах биологии — генетике, физиологии, цитологии, биохимии и др. Антропогенетика располагает также собственными методами исследования: цитогенетическим, близнецовым, генеалогическим и др.[[4]](#footnote-4)

Достижениями молекулярной биологии и биохимии внесен боль­шой вклад в развитие генетики. В настоящее время биохимическим и молекулярно-генетическим методам исследования принадлежит веду­щая роль в генетике человека и медицинской генетике. Однако и клас­сические методы генетики человека, такие как цитогенетический, генеалогический и близнецовый, имеют существенное значение в на­стоящее время, особенно в вопросах диагностики, медико-генетического консультирования и прогнозирования потомства.

Ознакомимся с возможностями цитогенетического метода.

Суть этого метода заключается в изучении строения отдельных хромосом, а также особенностей набора хромосом клеток человека в норме и патологии. Удобным объектом для этого служат лимфоциты, клетки эпителия щеки и другие клетки, которые легко получать, культивировать и подвергать кариологическому анализу. Это важный метод определения пола и хромосомных наследственных заболеваний человека.

Основой цитогенетического метода является изучение морфологии отдельных хромосом клеток человека. Современный этап познания строения хромосом характеризуется созданием молекулярных моделей этих важнейших структур ядра, изучением роли отдельных компо­нентов хромосом в хранении и передаче наследственной инфор­мации.

В главе 1 мы рассмотрели такие компоненты хромосом, как белки и нуклеиновые кислоты. Здесь же кратко остановимся на строении и морфологии хромосом.

**Строение хромосом.**

Хромосомную теорию наследственности создал американский уче­ный Т. Г. Морган. Проведя большое количество исследований на плодовой мушке дрозофиле, Морган и его ученики установили, что именно в хромосомах находятся открытые Менделем факторы наследственности, которые были названы генами. Т. Морган и его ученики показали, что гены расположены линейно по длине хромо­сомы.

После того как было доказано, что хромосомы являются осно­вными генофорами (носителями генов), начался период их наибо­лее интенсивного изучения. Успехи молекулярной биологии и генетики позволили понять некоторые закономерности строения и функциониро­вания хромосом прокариот и эукариот, однако многое здесь остается еще неизвестным. В последние годы хромосомы эукариот, особенно человека, становятся предметом изучения различных специалистов, начиная от генетиков и кончая физиками.

В настоящее время установлено, что в основе строения хромосомы лежит хроматин — сложный комплекс ДНК, белков, РНК и других веществ, входящих в хромосому (строение хроматина мы подробно рассмотрели в главе 1). Предполагается, что в хромосому человека входит одна гигантская молекула ДНК, молекулы РНК, гистоны и кислые белки, различные ферменты, фосфолипиды, металлы Са2+, Mg2+ и некоторые другие вещества. Способ укладки и взаимного расположения молекул этих химических соединений в хромосоме пока не известен. Длинная нить ДНК не может располагаться в хромосоме беспорядочно. Существует предположение, что нить ДНК упакована закономерным образом и связана с белками.

Ф. Арриги и соавторы (1971) установили, что уникальные последо­вательности занимают более 56% ДНК хромосом человека, высокопов­торяющиеся — 12,4 %, промежуточные повторы — 8 %. Общее количество повторяющихся генов в ДНК хромосомы человека равно 28%. Число хромосом у человека длительное время оставалось невыяснен­ным. Дело в том, что опреде­лить количество хромосом у млекопитающих, особенно у человека, было трудно. Хромо­сомы оказались маленькими, весьма многочисленными, пло­хо поддавались подсчету. При фиксации клетки они слива­лись в комки, что затрудняло определение истинного числа хромосом. Поэтому первые исследователи не могли точно и правильно подсчитать коли­чество хромосом в клетках человека. Называлось разное количество хромосом — от 44 до 50.

Обычно хромосомы в клетках наблюдают во время митоза на ста­дии метафазной пластинки. В интерфазном ядре хромосомы в световой микроскоп не видны. В 1912 г. Г. Винивартер, изучая хромосомы в сперматогониях и оогониях половых желез человека, удаленных во время операции, установил, что мужской набор хромосом (кариотип) содержит 47 хромосом, а женский — 48. В 1922 г. Т. Пайнтер повторил исследования Винивартера и установил, что мужской и женский кариотипы содержат по 48 хромосом, но женский отличается от мужского только двумя хромосомами. У женщин находится 2 большие половые хромосомы, а у мужчины одна большая Х-хромосома и одна маленькая К-хромосома. В последующие годы эту точку зрения под­держивали и другие ученые. П. И. Живаго и А. Г. Андреа (1932) предложили первую классификацию хромосом в зависимости от их длины. Так как хромосомы очень близко располагаются одна около другой и их очень трудно исследовать, то и в последующие го­ды точное число хромосом у человека служило предметом споров и дискуссий. Однако постепенно было достигнуто согласие между исследователями по этому вопросу, и в течение 30 лет большинство цитогенетиков считало, что у человека диплоидное число хромосом равно 48, а гаплоидное — 24. Усовершенствованные методы изучения хро­мосом позволили получить более точные сведения о количестве хромо­сом в клетках у человека, а также выявить аномалии нормального кариотипа, ответственные за некоторые уродства. Особенно плодотвор­ным оказались два метода:

1. Обработка культуры клеток алкалоидом колхицином, который ведет к накоплению делящихся клеток на стадии метафазы;

2. Обработка клеток слабыми растворами солей, вызывающими набухание, расправление хромосом, что облегчает их исследование.

В 1956 г. шведские цитологи Дж. Тийо и А. Леван изготовили культуры клеток из тканей легких, взятых у абортированных челове­ческих эмбрионов и, используя усовершенствованную методику обра­ботки клеток, получили необычайно четкие препараты, в которых ясно было видно 46 хромосом.[[5]](#footnote-5)

Несколькими месяцами позднее Ч. Форд и Дж. Хаммертон в Англии установили, что диплоидные предшественники половых клеток в се­менниках мужчин (сперматогонии) также имеют по 46 хромосом, а гаплоидные (сперматоциты 1-го деления) — по 23 хромосомы.

После этого были изучены многие клетки из разных органов и тканей человека и везде нормальное число хромосом оказалось равным 46.

Женский кариотип отличается от мужского только одной половой хромосомой. Остальные 22 пары одинаковы у мужчин и женщин. Эти 22 пары хромосом называются аутосомами. Нормальный кариотип состоит из 44 аутосом (22 пары) и двух половых хромосом — *XX* у женщин и *XY* у мужчин, т. е. женский кариотип имеет две большие половые хромосомы, а мужской — одну большую и одну малень­кую.

В половых клетках человека находится одинарный (гаплоидный) набор хромосом — 23, а в соматических клетках — двойной (диплоидный) набор — 46. Эти открытия стимулировали дальнейшее изу­чение хромосом. Были разработаны методы исследования хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови и на других объектах. В настоящее время хромосомы относительно легко исследуют в лим­фоцитах периферической крови. Венозную кровь помещают в специ­альную питательную среду, добавляют фитогемаглютинин, который стимулирует клетки к делению, и помещают на 72 ч. в термостат. За 6 ч. до конца инкубации сюда добавляют колхицин, который за­держивает процесс деления клеток на стадии метафазной пластинки. Затем культуру помещают в гипотонический раствор NaCl, в котором клетки набухают, что приводит к легкому разрыву оболочек ядра и переходу хромосом в цитоплазму. После этого препараты окрашивают ядерными красителями, в частности ацетоорсеином, и рассматривают их в световом микроскопе с иммерсией.

Под микроскопом учитывают общее количество хромосом, фото­графируют их, затем из фото вырезают ножницами каждую хромосому и наклеивают на чистый лист бумаги в ряд, начиная от самой боль­шой (первой) хромосомы и кончая самой маленькой (двадцать второй) и половой Y-хромосомой. Люминесцентная методика позволяет быстро и просто проводить массовые исследования с целью выявления боль­ных с различными типами хромосомных аномалий. Совокупность коли­чественных (число хромосом и их размеры) и качественных (морфо­логия хромосом) признаков диплоидного набора единичной клетки обозначается термином «кариотип». Строение хромосом изменяется в зависимости от стадии деления клеток (профазы, метафазы, анафазы, телофазы).

Уже в профазе митоза видно, что хромосома образована двумя взаимно переплетающимися нитями одинакового диаметра — хроматидами. В метафазе хромосома уже спирализована, и две ее хроматиды ложатся параллельно, разделенные узкой щелью. Каждая хроматида состоит из двух полухроматид. В результате митоза хроматиды мате­ринской хромосомы становятся сестринскими хромосомами, а полухроматиды — их хроматидами. В основе хроматид лежат хромонемы — так называют более тонкие нити ДНП, состоящие из белка и нуклеи­новых кислот.

В интерфазе (промежуток между двумя делениями клеток) хрома­тин тесно связан с ядерными мембранами и ядерным белковым матриксом. Он образует также большие участки деспирализованных ни­тей ДНП. Затем постепенно хроматин спирализуется, образуя типич­ные метафазные хромосомы. Размеры их варьируют от 2 до 10 микрон.

В настоящее время интенсивно исследуются структурные особен­ности аутосом и половых хромосом (на клетках костного мозга, лимфоцитах, фибробластах, клетках кожи, регенерирующей печени).

В хромосомах выявлены структуры, названные хромомерами. Хромомер — это спирализованный участок хромонемы. Промежутки меж­ду хромомерами представлены хромонемными нитями. Расположение хромомеров на каждой хромосоме строго фиксировано, наследственно детерминировано.

Хромомер — сравнительно крупная генетическая единица, сравни­мая по длине с хромосомой кишечной палочки. Строение и функция хромомера — основная загадка современной генетики. Предполагают, что некоторые хромомеры — это один генетический локус, где есть один структурный ген и много генов регуляторных. Возможно, в дру­гих хромомерах располагается несколько структурных генов.

Хромонемы и хромомеры окружены неокрашивающимся вещест­вом — матриксом. Полагают, что матрикс содержит дезоксирибонуклеиновую и рибонуклеиновую кислоты, белки.

Определенные участки хромосом образуют ядрышки. Ядрышки — это более или менее деспирализованные участки хромосом, окружен­ные продуктами деятельности генов (рибосомы, частицы РНК и т. п.). Здесь идет синтез рибосомальной РНК, а также осуществляются определенные этапы формирования рибосом. В нем синтезируется боль­шая часть РНК клетки.

В метафазной хромосоме различают еще несколько образований: центромеру, два плеча хромосомы, теломеры и спутник.

Центромерный (meros — по-гречески, часть) участок хромосомы — это неокрашивающийся разрыв в хромосоме, видимый на препарате хромосом. Центромера содержит 2—3 пары хромомер, имеет сложное строение. Предполагают, что она направляет движение хро­мосомы в митозе. К центромерам прикрепляются нити веретена.

Теломеры — специальные структуры на концах хромосом — также имеют сложное строение. В их состав входит несколько хромомер. Теломеры предотвращают концевое присоединение метафазных хромо­сом друг к другу. Отсутствие теломеров делает хромосому «липкой» — она легко присоединяется к другим фрагментам хромосом.

Одни участки хромосомы называются эухроматиновыми, другие — гетерохроматиновыми. Эухроматиновые районы хромосом — это гене­тически активные участки, они содержат основной комплекс функ­ционирующих генов ядер. Потеря даже мельчайшего фрагмента эухроматина может вызвать гибель организма. Гетерохроматиновые районы хромосом — обычно сильно спирализованы и, как правило, генети­чески мало активны. В гетерохроматине находится ядрышковый ор­ганизатор. Потеря даже значительной части гетерохроматина часто не приводит организм к гибели. Гетерохроматиновые участки хромосомы реплицируются позднее, чем эухроматиновые. Следует помнить, что эухроматин и гетерохроматин — это не вещество, а функциональ­ное состояние хромосомы.

Если расположить фотографии гомологичных хромосом по мере возрастания их размеров, то можно получить так называемую идиограмму кариотипа. Таким образом, идиограмма — это графическое изображение хромосом. На идиограмме пары гомологов располагаются рядами в порядке убывающего размера.

У человека на идиограмме среди 46 хромосом различают три типа хромосом в зависимости от положения в хромосоме центромер:

1. Метацентрические — центромера занимает центральное поло­жение в хромосоме, оба плеча хромосомы имеют почти одинаковую длину;

2. Субметацентрические — центромера располагается ближе к одному концу хромосомы, в результате чего плечи хромосомы разной длины.

|  |
| --- |
| Классификация хромосом человека по размеру и расположению центромера |
| Группа хромосом | Номер по кариотипу | Характеристика хромосом |
| А(1) | 1,2,3 | 1 и 3 почти метацентрические и 2—крупная субметацентрическая |
| В (11) | 4,5 | крупные субакроцентрические |
| С (III) | 6—12 | средние субметацентрические |
| A(lV) | 13—15 | средние акроцентрические |
| E(V) | 16-18 | мелкие субметацентрические |
| F(VI) | 19—20 | самые мелкие мегацентрические |
| G(VII) | 21—22 | самые мелкие акроцентрические |
| Х-хромосома (относится к III группе | 23 | средняя почти метацентрическая |
| Y-хромосома | 23 | мелкая акроцентрическая |

3. Акроцентрические — центромера находится у конца хромосо­мы. Одно плечо очень короткое, другое длинное. Хромосомы не очень легко отличать одну от другой. Цитогенетики с целью унификации методов идентификации хромосом на конференции в 1960 г. в г. Ден­вере (США) предложили классификацию, учитывающую величину хромосом и расположения центромер. Патау в том же году дополнил эту классификацию и предложил разделить хромосомы на 7 групп. Согласно этой классификации, к первой группе А относятся крупные 1, 2 и 3 суб- и акроцентрические хромосомы. Ко второй группе В — крупные Субметацентрические пары 4—5. К третьей группе С относят­ся средние субакроцентрические (6—12 пары) и Х-хромосома, которая по величине находится между 6 и 7 хромосомами. К группе Д (чет­вертой) относятся средние акроцентрические хромосомы (13, 14 и 15 пары). К группе Е (пятой)— мелкие Субметацентрические хромосомы (16, 17 и 18 пары). К группе *F* (шестой) мелкие метацентрические (19 и 20 пары), а к группе G (седьмой) — самые мелкие акроцентрические хромосомы (21 и 22 пары) и мелкая акроцентрическая половая Y-хромосома (табл. 4).

Существуют и другие классификации хромосом (Лондонская, Па­рижская, Чикагская), в которых развиты, конкретизированы и до­полнены положения Денверской классификации, что в конечном итоге облегчает идентификацию и обозначение каждой из хромосом человека и их частей.

Акроцентрические хромосомы IV группы (Д, 13—15 пары) и груп­пы VII (G, 21—22 пары) на коротком плече несут маленькие дополнительные структуры, так называемые сателлиты. В некото­рых случаях эти сателлиты являются причиной сцепления хромосом между собой при делении клеток в мейозе, вследствие чего происходит неравномерное распреде­ление хромосом. В одной половой клетке оказывается 22 хромосомы, а в другой — 24. Так возникают моносомии и трисомии по той или иной паре хро­мосом. Фрагмент одной хромосомы мо­жет присоединиться к хромосоме дру­гой группы (например, фрагмент 21 или 22 присоединяется к 13 или 15). Так возникает транслокация. Трисомия 21-й хромосомы или транслокация ее фраг­мента являются причиной болезни Дауна.

Внутри семи этих групп хромосом на основании лишь внешних различий, видимых в простой микроскоп, провести идентификацию хромосом почти невоз­можно. Но при обработке хромосом акрихини притом и при помощи ряда дру­гих методов окраски их можно иден­тифицировать. Известны различные

способы дифференциальной окраски хромосом по Q-, G-, С-технике (А. Ф.Захаров, 1973) (рис. 27). Назовем некоторые методы идентифи­кации индивидуальных хромосом человека. Широко применяются раз­личные модификации так называемого метода *Q.* Например, метод QF — с использованием флюорохромов; метод QFQ — с использованием акрихина; метод QFH — с использованием специального красителя фир­мы «Хекст» № 33258, выявляющего повторяющиеся последовательности нуклеотидов в ДНК хромосом (сателлитную ДНК и т. п.). Мощным средством изучения и индивидуальной характеристики хромосом явля­ются модификации трипсинового метода GT. Назовем, например, GTG-метод, включающий обработку хромосом трипсином и окраску краси­телем Гимза, GTL-метод (обработка трипсином и окраска по Лейтману).

Известны методы с обработкой хромосом ацетатными солями и красителем Гимза, методы с использованием гидроокиси бария, акридиноранжа и другие.

ДНК хромосом выявляется при помощи реакции Фельгена, окраски метиловым зеленым, акридиноранжем, красителем № 33258 фирмы «Хекст». Акридиноранжевый краситель с ДНК однонитчатой образует димерные ассоциаты и дает красную люминесценцию, с двунитчатой спиральной ДНК образует одномерные ассоциаты и люминесцирует зеленым светом.

Измеряя интенсивность красной люминесценции, можно судить о количестве свободных мест в ДНП и хроматине, а отношение зеле­ная — красная люминесценция — о функциональной активности хро­мосом.

Гистоны и кислые белки хромосом выявляются при различных рН окраской бромфенодовым синим, зеленым прочным, серебрением, иммунолюминесцентным методом, РНК — окраской галлюцианиновыми квасцами, красителем фирмы «Хекст» № 1, акридиноранжем при нагревании до 60°.

Широко применяются электронная микроскопия, гистоавторадиография и ряд других методов.

В 1969 г. шведский биолог Т. Касперссон и его сотрудники пока­зали, что хромосомы, окрашенные горчичным акрихином и освещенные под микроскопом Наиболее длинноволновой частью ультрафиолетового спектра, начинают люминесцировать, причем одни участки хромосом светятся ярче, другие слабее. Причина этого — разный химический состав поверхности хромосомы. В последующие годы исследователи обнаружили, что концы Y-хромосомы человека светятся ярче любой другой хромосомы человека, поэтому Y-хромосому легко заметить на препарате.

Акрихиниприт преимущественно связывается с ГЦ-парами ДНК. Флюоресцируют отдельные диски гетерохроматиновых участков. Уда­ляют ДНК — свечение исчезает. Составлены карты флюоресцирующих хромосом. Из 27 видов млекопитающих только у человека, шимпанзе, гориллы и орангутанга светятся Y-хромосомы. Свечение связано с повторами генов, которые появились в эволюции 20 млн. лет назад.

Итак, в норме в соматических клетках человека находится 46 хромосом (23 пары), а в половых — 23 хромосомы, по одной хромо­соме каждой пары. При слиянии сперматозоида и яйцеклетки в зиготе количество хромосом удваивается. Таким образом, каждая сомати­ческая клетка организма человека содержит один набор отцовских хромосом и один набор материнских хромосом. Если у человека 46 хромосом, то у различных обезьян число хромосом равно 34, 42, 44, 54, 60, 66.

При действии ультразвука или высокого давления можно добиться разрыва нитей ДНК, которые входят в состав хромосомы, на отдель­ные фрагменты. Подогревая растворы ДНК до температуры 80—100°,

можно вызвать денатурацию ДНК, расхождение двух составляющих ее нитей. При определенных условиях разъединенные нити ДНК могут снова реассоциировать в устойчивую двунитчатую молекулу ДНК (реассоциация или ренатурация ДНК). Денатурацию и ренатурацию ДНК можно получить и на препаратах фиксированных хромосом, обрабатывая их соответствующим образом. Если после этого хромосо­мы окрасить красителем Гимза, то в них выявляется четкая поперечная исчерченность, состоящая из светлых и темных полос. Расположение этих полос в каждой хромосоме разное. Таким образом, по «Гимза-дискам» можно также идентифицировать каждую из 23 пар хро­мосом.

Этими и другими методиками, особенно гибридизацией соматиче­ских клеток различных животных и человека, пользуются для картиро­вания хромосом, т. е. для определения положения разных генов в той или иной хромосоме. В настоящее время в аутосомах и половых хро­мосомах человека картировано около 200 генов.

На конец 1975 г. было локализовано следующее количество генов в различных хромосомах человека (А. Ф. Захаров, 1977): 1 хромосома — 24 гена; 2 хромосомы — 10, 3—2, 4—3, 5—3, 6—14, 7—4, 8—1, 9—8, 10—5, 11—4, 12—10, 13—3, 14—3, 15—6, 16—4, 17—14, 18—1, 19—4, 20—3, 21—4, 22—1; Y-хромосома — 2; Х-хромосома — 95 генов.

### Глава 4. Половой хроматин.

В 1949 г. М. Барр и Ч. Бертрам, изучая нейро­ны кошки, обратили внимание на то, что в интерфазном ядре клетки содержится интенсивно окрашиваемое тельце, причем оно присутствует только в ядрах клеток самок и отсутствует у самцов. Оно было найдено у многих животных и всегда только у особей женского пола. Это тельце получило название полового хроматина, или тельца Барра. У ряда позвоночных и у человека оно появляется в раннем онтогенезе на стадии гаструлы, но раньше развития гонад (половых желез). На локализацию, форму и структуру полового хроматина не влияют поло­вые гормоны, следовательно, он не является вторичным половым признаком. Между числом телец полового хроматина и числом *X-*хромосом в ядре имеется прямая связь. Половой хроматин в интер­фазных ядрах обусловлен спирализацией одной из Х-хромосом, инактивация которой является механизмом, выравнивающим баланс генов половых хромосом в клетках самцов и самок (т. е. это один из механиз­мов дозовой компенсации генов).[[6]](#footnote-6)

В 1961 г. несколько исследователей одновременно высказали предположения, что одна из Х-хромосом у нормальных женщин отно­сительно не активна в генетическом отношении. В 1961 году англий­ская исследовательница М. Лайон выдвинула гипотезу о механизмах инактивации одной из Х-хромосом клеток женского организма. Основ­ные положения этой гипотезы следующие:

1. Одна из двух Х-хромосом клеток женщины неактивна.

2. Неактивная хромосома может быть отцовского или материнского организма.

3. Инактивация происходит в раннем эмбриогенезе и сохраняется во время дальнейшего размножения и развития клеточной линии. Этот процесс инактивации Х-хромосомы в ряду поколений обратим:

*XX\** ->- УХ *-> XX\** и т. д. (здесь звездочкой обозначена спирали-зованная Х-хромосома). Такой тип обратимых изменений генетического материала португальский генетик Серра предложил называть трепцией (от греч. treptos — изменение).

Спирализованная Х-хромосома в клетке образует половой хроматин или тельце Барра. Если у женщин в ядре клетки несколько Х-хромосом, то в клетках несколько телец Барра, активной остается лишь одна Х-хромосома. Х-хромосома инактивируется не вся, часть коротко­го плеча остается генетически активной. Инактивация Х-хромосомы в определенной мере зависит от стадии клеточного цикла и физиологи­ческого состояния организма. По наличию лишнего или отсутствию тельца Барра можно диагносцировать некоторые виды наследствен­ных заболеваний (например, синдром Клайнфельтера, синдром Шерешевского — Тернера). Клетки, не содержащие половой хроматин (хроматин-отрицательные клетки), обнаруживаются у индивидуумов, имеющих набор хромосом 45, ХО (синдром Шерешевского — Тернера);

46, *XY* (нормальные мужчины); 47, *XYY* (синдром Клайнфельтера с двумя Y-хромосомами). Обычно в клетках нормального мужского организма встречается некоторое количество псевдотелец Барра (конденсированных участков аутосом) и спирализованных Y-хромосом, поэтому при диагностике различных хромосомных заболева­ний необходимо уметь отличать эти образования от типичного полового хроматина, образованного спирализованной лишней Х-хромосомой. Тельце Барра обнаруживается при хромосомном наборе 46, XX (нормальные женщины); 47, ХХУ и 48, ХХУУ (клас­сический синдром Клайнфельтера). Два тельца Барра обнаруживаются у человека, имеющего три Х-хромосомы, (47, XXX); три Х-хромосомы и одну У (48, ХХХУ, синдром Клайнфельтера); 49, ХХХУУ (синдром Клайнфельтера). Три тельца Барра встречаются при кариотипе 48, ХХХХ и 49, ХХХХУ (тяжелый синдром Клайнфельтера).

В полиплоидных клетках число телец полового хроматина соот­ветствует плоидности. По формуле Гарднера, число телец Барра (В)

P

2

равно *В =* Х — , где *Х —* число Х-хромосом, *Р —* степень плоид­ности клетки. В неполиплоидных клетках число телец полового хромати­на равно числу Х-хромосом минус единица *(В* = *Х —* 1).

**Структурные изменения хромосом**

Хромосомы могут подвергаться различным структурным измене­ниям. Особенно важное значение имеют потеря отдельных фрагмен­тов хромосом (деления) или перенос участка одной хромосомы на дру­гую (транслокация). Транслокация обозначается латинской буквой /, в скобках рядом с ней пишут индекс группы или номер хромосомы-донора, обозначение переносимого участка. Эти же обозначения ука­зываются для хромосомы-реципиента, например 46, *XXt* *(Ср* + + В4*q* —). В скобках буквами *р* и *q* указывают плечи хромосом, затрагиваемые транслокацией. Короткое плечо хромосомы обозна­чают буквой *р,* длинное — буквой *q,* спутник — буквой s, и т. д. Уве­личение длины плеча обозначается знаком плюс, а уменьшение — зна­ком минус (оба они ставятся после символа хромосомы).

Появление одной лишней хромосомы в кариотипе приводит к трисомии. Кратное увеличение числа всех хромосом носит название поли­плоидии (могут быть триплоиды, тетраплоиды и т. д.). Потеря одной из пары гомологичных хромосом приводит к состоянию, которое на­зывается моносомией. Изменения числа или строения хромосом назы­вается хромосомными аберрациями.

Рассмотрим наиболее частые виды структурных нарушений хро­мосом — делеции и транслокации. При делеции общее количество хромосом не изменено. Однако в какой-то хромосоме недостает гене­тического материала, что вызывает различные изменения фенотипа. Чаще всего встречается делеция 5-й и 18-й аутосом и Х-хромосомы. Делеции приводят к развитию различных наследственных заболеваний и синдромов.

В 1963 г. Ж. Лежен описал синдром «кошачьего крика». Крик таких детей напоминает «мяуканье кошки». У детей резкое недораз­витие гортани, круглое лунообразное лицо, микроцефалия, микрогнатия, монголоидный разрез глаз, низко расположенные деформированные ушные раковины, мышечная гипотония, слабо выраженные вторичные половые признаки. Эти дети умственно отсталые. В кариотипе детей отмечается делеция короткого плеча 5-й пары хромосом.

Деления длинного и короткого плеча 18-й хромосомы сопровож­дается различными нарушениями строения лица, скелета, внутренних органов. У детей отмечается умственная отсталость, гипотрофия, гипотония, микроцефалия, недоразвитие лица, низкий грубый голос, недоразвитие наружных половых органов, среднего уха, атрезия наружного слухового прохода и другие аномалии.

При делеции короткого плеча 18-й хромосомы у больных также отмечаются различные дефекты со стороны скелета, внутренних орга­нов и умственная отсталость.

Делеция короткого плеча Х-хромосомы может трактоваться как частичная моносомия по Х-хромосоме. Описана у женщин, у которых наблюдается задержка роста, недоразвитие яичников без тяжелых соматических аномалий. Хотя половой хроматин у них выявляется, однако его размеры значительно меньше, чем в норме.

При хронических миелолейкозах отмечается укорочение корот­кого плеча 21-й хромосомы (так называемая филадельфийская хро­мосома). Однако эта хромосома обнаруживается только в клетках крови и пунктате костного мозга. Другие же клетки имеют нормальный кариотип.

В результате двух концевых нехваток с последующим соединением разорванных концов образуются кольцевые хромосомы. Поэтому дан­ное нарушение структуры хромосом фактически является частным случаем делеции. Клиническая картина больных — носителей кольце­вых хромосом — напоминает таковую при делеции соответствующей хромосомы. Так, при кольцевой хромосоме группы В (5-я пара) раз­вивается клиническая картина синдрома «кошачьего крика», а при кольцевой Х-хромосоме клиническая картина близка синдрому Шерешевского — Тернера.

Транслокации — это структурные перестройки, при которых про­исходит обмен генетического материала между хромосомами. Возмож­ны различные виды транслокаций: реципрокные, при которых про­исходит взаимный обмен фрагментами; нереципрокные, когда генети­ческий материал одной хромосомы переносится на другую, и наконец центрические соединения. Наиболее часто встречаются именно пос­ледние транслокации между акроцентрическими хромосомами. При этом утрачивается только небольшой фрагмент коротких плечей акроцентрических хромосом. Большую часть таких перестроек можно считать сбалансированной, так как они не вызывают серьезных откло­нений в фенотипе носителя транслокации. Однако потомство таких носителей имеет клинически выраженные дефекты, характерные для аномального набора хромосом.

Известно, что болезнь Дауна может наблюдаться как при трисомии по 21-й аутосоме, так и при транслокации фрагмента этой хромо­сомы на другие. У таких больных хромосом 46, но одна из хромосом фактически двойная, так как к ней еще прикреплен фрагмент 21-й хромосомы и в результате такая перестройка оказывается не сбалан­сированной. У родителей этих больных кариотип включал 45 хромосом, но одна из хромосом была фактически двойной (с транслокацией). При оплодотворении яйцеклетки, содержащей эту хромосому, нормаль­ным спермием в зиготе фактически будут три 21-х хромосомы, что фенотипически проявляется болезнью Дауна.

21-я хромосома чаще всего транслоцируется на 15-ю или на дру­гие хромосомы группы Д (13-ю, 14-ю) у женщин, или на 22-ю у муж­чин. В таком случае у молодых здоровых родителей может ро­диться ребенок с болезнью Дауна в отличие от трисомии 21-й хро­мосомы, которая чаще бывает у детей, рожденных пожилыми мате­рями. Определить наличие транслокации у индивидуума до рождения ребенка с болезнью Дауна без исследования кариотипа фактически невозможно, так как фенотип этих носителей мало чем отличается от фенотипов лиц с нормальными генотипами. Поэтому во всех этих слу­чаях исследование кариотипа имеет особенно важное значение.

Механизм развития болезни Дауна при транслокации у одного из родителей можно представить следующим образом. При трансло­кации кариотип индивидуума состоит из 45 хромосом, так как одна хромосома увеличена в размере. Транслокация касается всех клеток, в том числе и оогоний и сперматогоний. При образовании половых клеток (гамет) в одну гамету попадает 23 хромосомы, а в другую 22. Но транслоцированная хромосома может оказаться как в гамете с 22 хромосомами, так и в гамете с 23 хромосомами. Таким образом, те­оретически возможны 4 варианта гамет: 23 нормальные хромосомы, 23 с транслокацией, 22 нормальные хромосомы и 22 с транслокацией. Если транслокацию обозначить апострофом, то получится следующий ряд гамет: 23 231  22 221.

Если эти гаметы будут оплодотворены нормальной гаметой про­тивоположного пола, то получим следующие комбинации: 1) 23 + 23 = = 46 хромосом (нормальный кариотип); 2) 231 + 23 = 461 хромосом, но фактически 47 хромосом (в данном случае разовьется болезнь Дау­на); 3) 22 + 23 = 45 хромосом (такая зигота не жизнеспособна и по­гибает); 4) 221 +23 = 451 хромосом (в этом случае рождается ин­дивидуум с транслокацией, как и один из его родителей).

Шансы родить ребенка с болезнью Дауна (при транслокации у одного из родителей) составляют 33%. Это очень большой риск и в таком случае дальнейшее деторождение не желательно, тем более что есть риск получить транслокацию и у внуков. Если рождается ребе­нок с болезнью Дауна, вызванной трисомией по 21-й хромосоме, у родителей с нормальным кариотипом, то шансы родить повторно та­кого же ребенка очень незначительны. Однако не во всех случаях при рождении ребенка с болезнью Дауна вследствие транслокации 21-й хромосомы транслокация имеется в соматических клетках ма­тери. Примерно у половины матерей кариотип бывает нормаль­ный, а транслокация произошла во время мейоза, предшествующего образованию яйцеклетки, из которой развился организм больного ребенка.

### Глава 5. Мозаицизм.

Это состояние, когда в организме перемешаны клетки с нормальным и аномальным кариотипами, скажем, 46/47 или 46/45. Возникает оно вследствие нерасхождения хромосом на начальных этапах эмбрионального развития. Мозаицизм дает стертые, слабо выраженные симптомы заболевания по сравнению с больными, у которых изменен кариотип во всех клетках. Больной с мозаичным ва­риантом болезни Дауна может иметь только некоторые физические признаки этого заболевания. Развитие интеллекта не нарушено. При мозиацизме 45ХО/46ХХ синдром Шерешевского — Тернера выражен более мягко. У таких больных возможно развитие тканей яичников и овуляция. При кариотипе 46ХУ/47ХХУ более мягко выражен синд­ром Клайнфельтера. Среди больных женщины- и мужчины-мозаи­ки с указанными кариотипами встречаются чаще, чем «чистые» слу­чаи синдрома Шерешевского — Тернера или синдрома Клайнфельтера. С возрастом клон аномальных клеток постепенно элиминируется, и поэтому трудно установить мозаицизм в пожилом возрасте, хотя в эмбриональном и раннем постэмбриональном периоде он был выражен достаточно и мог привести к развитию фенотипических признаков заболевания. Чем меньше в организме аномальных клеток, тем слабее выражены признаки заболевания. Этим можно объяснить стертые и рудиментарные формы данных заболеваний.[[7]](#footnote-7)

При заболеваниях крови может происходить кратное (полиплоидия) или некратное (анэуплоидия) увеличение количества хромосом. Однако оно наблюдается только в клетках крови, а в других же соматических клетках кариотип нормальный.

Список использованной литературы.

1. Бердышев Г.Д., Криворучко И.Ф. Генетика человека с основами медицинской генетики. – Киев: Вища школа, 1979.
2. Бочков Н.П. Генетика человека. – Москва, 1973.
3. Фогель Ф. Мотульски А. Генетика человека: история хромосомы человека, формальная генетика. Москва: Мир, 1989.
4. Штерн, Курт Основы генетики человека. Москва: Медицина, 1965
5. Маккьюсик В. Генетика человека. Москва: Мир, 1967.
1. Генетика человека с основами медицинской генетики. Бердышев Г.Д., Криворучко И.Ф. с.5-21 [↑](#footnote-ref-1)
2. Генетика человека: история хромосомы человека, формальная генетика. Фогель Ф. Мотульски А. с.11-19 [↑](#footnote-ref-2)
3. Генетика человека: история хромосомы человека, формальная генетика. Фогель Ф. Мотульски А. с.23-31 [↑](#footnote-ref-3)
4. Генетика человека. Бочков Н.П. с. 44 [↑](#footnote-ref-4)
5. Генетика человека. Маккьюсик. В. с.10, 13-22 [↑](#footnote-ref-5)
6. Основы генетики человека. Штерн, Курт. с.41-60 [↑](#footnote-ref-6)
7. Генетика человека. Бочков Н.П. с.90 [↑](#footnote-ref-7)