

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



## Лекція 3

**Тема:** Хромосоми людини

План:

1. Структура та властивості хромосом
2. Диференціальне забарвлення хромосом
3. Характеристика каріотипу людини

### 1. СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ ХРОМОСОМ

**Хромосоми** – високоспеціалізовані компоненти клітинного ядра, що мають свою індивідуальність, виконують певну функцію та здатні відтворюватись у низці поколінь.

Хромосоми носії спадкової інформації. У хромосомах зберігається, відтворюється і передається спадкова інформація. У хромосомах записана спадкова інформація про всі ознаки організму: якою людина була, якою є і якою буде.

За хімічним складом хромосома – це комплекс ДНК з білками ДНП (дезоксинуклеопротейд), частка якого становить 90% усього хімічного складу. Вміст ДНК у хромосомах постійний. До складу входять також РНК-, ДНК-полімерази, ліпіди та мінеральні речовини – йони  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ .

Існують наступні **особливості хромосом** багатоклітинних організмів:

1. Кількість хромосом у соматичних клітинах організму постійна.
2. Кількість хромосом у різних організмів одного виду однакова.
3. Організми, які належать до одного виду, мають однаковий каріотип (диплоїдний набір хромосом соматичної клітини).
4. Кількість хромосом у соматичних клітинах завжди парна ( $2n$ ).
5. Парні хромосоми – гомологічні, мають однакові розміри, форму, містять алельні гени.

Найзручніше вивчати структуру хромосом у стадії **метафази** мітозу. У цю фазу хромосоми максимально спіралізовані, укорочені, стовщені, тому чітко видно їхню структуру під мікроскопом).

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



Метафазна хромосома складається з двох **хроматид**. В основі кожної хроматиди є молекула ДНК. Хроматиди з'єднуються між собою за допомогою тільця – **кінетохора**. У цьому місці на хромосомі знаходиться первинна перетяжка – **центромера**. До кінетохора прикріплюються нитки ахроматинового веретена поділу. Центромера поділяє хромосому на плечі. Розміщення центромери суворо постійне для кожної хромосоми. Залежно від розміщення центромери хромосоми бувають:

- **Метацентричними** (рівноплечевими);
- **Субметацентричними** (нерівномірноплечовими);
- **Акроцентричними** (різко редуковане одне плече, і воно важко визначається);
- **Супутниковими** (є ще вторинна перетяжка, яка відокремлює від хромосоми супутник – сателіт).

Структурною основою хромосоми є молекули ДНК. У процесі формування хромосом молекули ДНК зв'язуються з білками, спіралізуються – молекула ДНК скорочується в 10 000 разів (довжина деспіралізованої молекули ДНК становить близько 2 м). Білки забезпечують стійкість компактної структури на різних рівнях організації хромосом.

**Білки**, що входять до складу хроматину, зазвичай поділяють на дві групи: **гістонові** й **негістонові**. **Білки-гістони** здійснюють перші етапи упаковки ДНК. Це глобулярні білки з відносно високим вмістом амінокислот (аргініну й лізину), які надають основних властивостей хромосомі.

Виділяють такі рівні організації хромосом:

I – нуклеосомний;

II – супернуклеосомний;

III – утворення доменів;

IV – утворення розеткоподібних структур – хромомерів;

V – утворення метафазних хромосом (суперспіралізація).

**I рівень – нуклеосомний**. На цьому рівні утворюються нуклеосоми. Нуклеосома – це ділянка молекули ДНК, що складається із 146 нуклеотидних пар, навивається (2 витки) на білковий октомер, який вміщує 8 молекул білків-гістонів  $H_4$ ,  $H_3$ ,  $H_2A$ ,  $H_2B$ . Ділянка ДНК між нуклеосомами називається лінкерною. Молекула ДНК скорочується в 6-7 разів.

**II рівень – супернуклеосомний**. Забезпечується за допомогою білка гістону  $H_2$ . Молекула білка зв'язується з лінкерними ділянками й поверхнею хромосом. Виникає впорядкована структура спірального типу, яку називають соленоїдом. Компактність ДНК збільшується в 40 разів. Під

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



електронним мікроскопом структура має вигляд фібрили хроматину.

**III рівень – утворення доменів** – поперечнопетлистих структур уздовж хроматину. Кожна петля містить 20 000 – 200 000 пар нуклеотидів. Утворення цієї структури забезпечується **негістоновими білками**. На цьому рівні організації хроматин представлений в активній формі – у ньому відбувається транскрипція. Такий хроматин називають **евхроматином** (еухроматином).

**IV рівень – утворення розеткоподібних структур** – хромомерів унаслідок спіралізації.

**V рівень – утворення метафазних хромосом** – паличкоподібних структур. В основі цього процесу лежить суперспіралізація хроматину.

На цих етапах хроматин неактивний і його називають **гетерохроматином**.

Формування хромосом починається в постсинтетичний період інтерфази й завершується в метафазі мітозу.

Таким чином, за допомогою білків кожна довга молекула ДНК «упаковується» й набуває вигляд паличкоподібної структури.

Компактна упаковка спадкового матеріалу у вигляді паличкоподібних хромосом забезпечує безперешкодне переміщення до полюсів у анафазі мітозу й рівномірний розподіл спадкового матеріалу.

Кожен вид рослин і тварин має певну постійну кількість хромосом. У всіх соматичних клітинах кількість хромосом завжди парна, тому що кожна хромосома має подібну собі, парну. Вони однакові за розміром, формою, розміщенням центромери, мають один і той самий склад, оскільки містять алельні гени. Такі хромосоми називають **гомологічними**. Винятком із парності становлять статеві хромосоми в чоловіків X і Y. Набір хромосом соматичних клітин називають **диплоїдним**, його позначають 2n.

Диплоїдний набір хромосом соматичних клітин організмів певного біологічного виду називають **каріотипом**. Для кожного каріотипу характерна постійна кількість, форма і розміри хромосом. Під час дозрівання статевих клітин кожна пара гомологічних хромосом розподіляється по різних гаметах, тому гамети мають половинний (**гаплоїдний**) набір хромосом, який позначається n.

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



## 2. ДИФЕРЕНЦІАЛЬНЕ ЗАБАРВЛЕННЯ ХРОМОСОМ

Винайдення диференціального забарвлення хромосом мало вирішальне значення для поглиблення знань щодо організації хромосом і для ідентифікації хромосом. Вирішальним чинником для розвитку та вдосконалення методів забарвлення хромосом був саме запит сформований практичними потребами медичної генетики. Була необхідність чіткої ідентифікації кількості та структурних перебудов хромосом.

Наразі основні методологічні прийоми диференціального забарвлення хромосом вже сформовані. Розташування в хромосомах по різному забарвлених сегментів єдине для Q, G та R-забарвлень і його схема запропонована на Паризькій раді по стандартизації номенклатури в цитогенетиці людини стала загально визнаною. В доповнення до закріплених на цій раді чотирьох видів забарвлення продовжують розроблятися забарвлення окремих специфічних ділянок хромосом. При цитогенетичному дослідженні незвичайних, унікальних та суперечливих зразків використовують комплекс методик, які доповнюють одна одну.

### **Диференціальне забарвлення хромосом флуорохромами (Q-забарвлення).**

У 1969 році Caspersson зі співробітниками успішно випробували для вибіркового забарвлення ділянок хромосом *Vicia faba* акрихін-іприт, акрихін та деякі інші амінопохідні акредину. Найбільш чітке, стабільне та повторюване диференціальне свічення надавав акрихін-іприт, що і визначило використання саме його для забарвлення хромосом людини. Після оприлюднення у 1971 році праць O'Riordan зі співробітниками в яких зазначалось, що не менш ефективним є використання акрихіну без іприту, саме він став застосовуватись найчастіше при дослідженнях.

### **Один з варіантів техніки забарвлення:**

Робочий розчин барвника – акрихіну містить 0,5-1,0 мг акрихіну, 20 мл стандартного фосфатного чи цитратно-фосфатного буферу (рН 6,5-7,0) і 80 мл води. Для прибирання гіпотонічного ефекту до розчину рекомендують додавати 0,2-0,4г NaCl проте при цьому знижується яскравість свічення та світлорезистентність. Робочий розчин зберігається до 2-3 діб. Забарвлення проводять за умов кімнатної температури не менш 5-6 хвилин.

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



Диференціальність свічення складається з чергування вздовж хромосоми сегментів різної яскравості. Виділяють сегменти що зовсім не світяться, сегменти з слабким, середнім, інтенсивним та дуже інтенсивним свіченням. Хромосоми які не відрізняються за розмірами та формою, порівняно легко можуть бути ідентифіковані та відрізняються одна від одно за кількістю, розмірами та розташуванням по-різному забарвлених сегментів. Слід враховувати наявність нормального поліморфізму хромосом людини за гетерохроматиновими регіонами. Цей поліморфізм особливо помітний якщо між собою відрізняються гомологічні хромосоми.

В аутосомі 1 довге плече відрізняється від короткого темним сегментом біля центромери і чіткими сегментами середньої та сильної флуоресценції в решті плеча. В аутосомі 3 за коротке плече приймають те, в якому дистальний слабо флуоресцентний сегмент більшого розміру, а той що знаходиться перед ним менший за розміром, ніж однакові за розташуванням сегменти другого плеча. Аутосома 4 відрізняється від аутосоми 5 вузьким слабо яскравим сегментом в проксимальній частині довгого плеча, але в хромосомі 5 слабше світиться дистальний район довгого плеча. Аутосома 6 відрізняється від інших хромосом своєї групи більш слабо яскравим серединним районом короткого плеча.

Аутосома 7 відрізняється двома великими інтенсивно яскравими сегментами, які займають майже все довге плече. Подібний малюнок довгого плеча і у аутосоми 9, проте вона добре відрізняється за не яскравим великим біля центромерним районом. Хромосоми 8 та 10 відрізняються від інших в групі тим, що їх довге плече представлено трьома великими блоками яскравого матеріалу, між собою вони відрізняються, окрім розмірів і форми, меншою чіткістю диференціювання довгого плеча у 8 і більшими розмірами проксимального яскравого блоку у 10. Профіль свічення аутосом 11 и 12 дуже характерний, що різко відрізняє їх від інших хромосом, відмінні вони і між собою.

Аутосома 13 на відміну від інших в цій групі має два великих яскравих блоки в дистальних двох третинах довгого плеча. В аутосомах 14 та 15 більш інтенсивно флуоресцентують проксимальні половини плечей, між собою вони відрізняються присутністю в 14 короткого дуже яскравого сегменту в дистальній половині довгого плеча і деталями сегментації проксимальної його половини. Аутосоми 17 та 18 відрізняються послабленою флуоресценцією проксимальної половини довгого



## ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ

плеча у 17, з вузькою майже без яскравості половою дещо проксимальніше середини плеча. В групі F хромосома яка найменше світиться прийнята за аутосому 19, аутосома 20 відрізняється свіченням середньої яскравості у короткому плечі. G-хромосоми легко розрізняються завдяки інтенсивному свіченню проксимальних половин довгих плечей у хромосоми 21.

X-хромосома легко відрізняється від відповідних аутосом наявністю двох інтенсивних за яскравістю великих сегментів: в середині короткого і проксимальній половині довгого плеча. В жіночому наборі X-хромосоми не відрізняються. Для Y-хромосоми характерна надзвичайно яскрава флуоресценція дистальної частини довгого плеча. Варіабельність розмірів цієї хромосоми визначається зміною кількості саме цієї її частини. Яскраво флуоресцентна частина Y-хромосоми неоднорідна і поділяється на ділянки різної інтенсивності.

### Диференціальне забарвлення хромосом барвником Гімзи (G-забарвлення).

Варіант забарвлення хромосом за Гімзе набув більшої популярності через відносно просту техніку виконання та чіткість нерівномірного забарвлення всіх хромосом. Це забарвлення має десятки модифікацій.

Всі варіанти обробки можна поділити на **кілька груп**:

1. Інкубація препаратів у водних розчинах солей, без  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ , при температурі до  $+37^{\circ}\text{C}$ . Використовують фосфатно-цитратні буферні розчини або розчини інших солей.
2. Інкубація в стандартному сольовому розчині (SSC) або у фосфатному буфері при підвищених температурах ( $+60^{\circ}\text{C}$  та вище). Молярність та рН розчину, тривалість та температура інкубації варіюють.
3. Інкубація в сольових розчинах з додаванням протеолітичних ферментів: трипсину, пронази та інших. Концентрація розчинів ферментів та тривалість експозиції з ними варіюють.
4. Вплив на препарати речовинами що розчиняють білок та здійснюють хеліруючий вплив (наприклад, сечовина, 2-серкаптоетанол, додецилсульфат натрію тощо).
5. Вплив на препарат лужних розчинів з наступною тепловою інкубацією в розчині SSC або в фосфатному буфері.
6. Короткотермінове кип'ятіння препаратів з наступною тепловою інкубацією в розчині SSC.

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



В **найпростішому варіанті** забарвлення проводять так: при температурі 25-27°C впродовж 10-12 хвилин препарати витримують у розчині який складається з 1 мл стандартного барвника Гімзи, 49 мл фосфатного буферу з рН 6,8 та 0,1 мл 0,25% розчину трипсину.

Повздожне диференціальне забарвлення сходне та подібне до Q-забарвлення. Істотна відмінність полягає у більш щільному забарвленні також і великих гетерохроматинових ділянок в хромосомах 1 та 16 і більшості центромерних районів. Гетерохроматиновий блок довгого плеча аутосоми 9 забарвлюється не постійно, не завжди також забарвлюється і дистальна частина Y-хромосоми.

## **R-забарвлення.**

Забарвлення за методом Гімзи хромосомних препаратів, які пройшли інкубацію при +87°C, протягом 10-12 хвилин в фосфатному буфері рН 6,5 також призводить до нерівномірного розподілу барвника вздовж хромосом при слабкій загальній інтенсивності забарвлення. Розподіл забарвлених та незабарвлених сегментів виявився зворотнім відображенням двох попередніх типів забарвлення.

## **C-забарвлення.**

Основною вимогою отримання C-забарвлення хромосом полягає у тому, що вплив який руйнує хромосомну структуру (інкубаційний вплив) повинен бути достатнім щоб здатність забарвлюватись зберегли лише райони структурного гетерохроматину, збагаченого сателітною ДНК. Для отримання такого ефекту зазвичай використовується короткочасна обробка препаратів в лужному середовищі за умов кімнатної температури з наступною інкубацією протягом багатьох годин у розчині SSC при + 650C.

C-забарвлення виявляє райони структурного гетерохроматину найбільш стійкого до впливу фізичних та хімічних чинників. У всіх аутосомах та у X-хромосоми людини це райони розташовані біля центромери, а в Y-хромосомі – в дистальній частині довгого плеча. По розташуванню та за розмірами ці блоки індивідуальних хромосом, за виключенням хромосом 1, 9 та 16, різко, зазвичай, не відрізняються, тому C-забарвлення не може слугувати для ідентифікації хромосом окремо від інших методів забарвлення.

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



## 3. ХАРАКТЕРИСТИКА КАРІОТИПУ ЛЮДИНИ

**Каріотип людини** складається з 46 хромосом (23 пари гомологічних хромосом). Із них 44 (22 пари) – це **автосоми** (аутосоми, нестатеві хромосоми) і одна пара статевих хромосом: у чоловіків вона позначається X і Y (XY), а в жінок – XX.

Статеві хромосоми чоловіків не гомологічні. Вони мають різні форму, розміри і склад генів, тому їх називають **гетерохромосомами**. X- та Y-хромосоми не гомологічні, але в них є гомологічні ділянки, які містять алельні гени.

Статеві хромосоми визначають стать людини. У жінок усі яйцеклітини несуть X-хромосому, тому жіночий організм називають **гомогаметним**. У чоловіків половина сперматозоїдів несе X-хромосому, а друга половина – Y-хромосому, тому чоловічий організм називають **гетерогаметним**.

Якщо гомологічні хромосоми розмістити попарно в міру зменшення їхніх розмірів, то одержимо ідіограму, на якій усі хромосоми поділено на 7 груп. Денверська класифікація хромосом ґрунтується на величині й розміщенні центромери, а також плечей хромосоми.

Група	Розмір і тип	Номер	Кількість
A	Великі метацентричні та субметацентричні	1-3	6
B	Великі субметацентричні	4, 5	4
C	Середні субметацентричні	6-12, X	15 (чоловіки) 16 (жінки)
D	Середні акроцентричні	13-15	6
E	Дрібні метацентричні	16-18	6
F	Найдрібніші метацентричні	19-20	4
G	Дрібні акроцентричні	21, 22, Y	5 (чоловіки) 4 (жінки)

Існує багато технічних можливостей, що дають змогу розмежовувати кожен пару хромосом і детально вивчати структуру кожної окремої хромосоми. Широко застосовують методи клітинних культур для отримання клітин, що поділяються мітотично, використання колхіцину для накопичення останніх у



# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



метафазі мітозу, методи впливу гіпотонічного розчину для полегшення розміщення хромосом на цитологічному препараті.

За допомогою методів радіаційних попередників ДНК і автографії відкрито доступ для аналізу репродукції хромосом. Дані, отримані цими методами на хромосомах людини, стали важливим внеском в розроблення проблеми структурно-функціональної організації хромосом еукаріот в цілому.

Якісний методологічний стрибок було зроблено у світлооптичному вивченні хромосом. Завдяки новим способам диференціального забарвлення хромосом біло виявлено існування глибокої лінійної диференціації метафазних хромосом, досить специфічної для кожної хромосоми з набору. Внаслідок цього вдалося вирішити найважливіше завдання – ідентифікувати в метафазі мітозу всі хромосоми людини та скласти для кожної з них цитологічну карту лінійної неоднорідності.

Будь-які зміни в каріотипі призводять до значних порушень обміну речовин та будови організму в цілому, Ці зміни, як правило, не сумісні з життям. Такі зиготи не розвиваються або плід гине на ранніх стадіях розвитку, що призводить до самовільних викиднів або мертвонародження. Чим більше змін у каріотипі, тим тяжчі дефекти виявляються в організмі. Збільшення кількості хромосом називають **полісомією**, зменшення їх кількості – **моносомією**.

Моносомії усі летальні, крім моносомії за X-хромосомою у жінок – 45, X0. У цих жінок спостерігається синдром Шершевського-Тернера. Такі жінки мають низький зріст, у них недорозвинені матка та яєчники, вторинні статеві ознаки, коротка шия, крилоподібна складка на шиї, деформація стоп і рук та інші порушення.

Полісомія 1-10-ї пар хромосом закінчується летально в період внутрішньоутробного розвитку. Полісомія 13-ї хромосоми спричиняє синдром Патау, полісомія 18-ї хромосоми – синдром Едвардса. Полісомія 21-ї пари – хворобу Дауна, полісомія статевої пари хромосом призводить у жінок до трисомії X-хромосоми, у чоловіків до синдрому Клайнфельтера. Чим дрібніші хромосоми, тим сприятливіший прогноз. Хворі із синдромами Патау та Едвардса помирають у перші місяці життя, з хворобою Дауна живуть 25-35 років і помирають переважно у юнацькому віці від вторинно приєднаних інфекцій. Хворі з трисомією статевої пари хромосом можуть дожити до глибокої старості.

Вивчаючи під мікроскопом пофарбовані препарати ядер клітини, можна помітити, що деякі частини хромосом забарвлені

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



дуже інтенсивно, а інші слабше. Інтенсивно забарвлений хроматин має назву гетерохроматину, а менш інтенсивно – еухроматину. Гетерохроматинові ділянки розташовуються за всією довжиною хромосоми, але частіше поблизу центромери і на кінцях. Він зберігається у висококонденсованій формі протягом усього процесу клітинного поділу і зазвичай генетично неактивний. В інтерфазному ядрі гетерохроматин має вигляд глибок. Статеві хромосоми часто майже повністю представлені гетерохроматином.

Більшість генів еукаріот містяться в еухроматинових ділянках хромосом. Еухроматин менш конденсований, тому він генетично активний і менш забарвлений.

Каріотип чоловіка складається із 46 хромосом, 44 з яких нестатеві (аутосоми) і одна пара статевих хромосом; їхнє умовне позначення XY. Нормальний каріотип чоловіка можна записати так: 46, XY або 44+XY.

Каріотип жінки також складається з 46 хромосом, з яких 44 – аутосоми і одна пара статевих хромосом, які умовно позначаються XX. X-хромосома значно більша, ніж Y-хромосома. В інтерфазному ядрі жіночого організму активна лише одна X-хромосома, а інша спіралізована, сильно конденсована і тому інтенсивно забарвлена, тобто настає компенсація фази активності генетичної інформації. Вона під мікроскопом матиме вигляд темної плями біля ядерної оболонки. Неактивна, спіралізована X-хромосома називається статевим X-хроматином. Нормальний каріотип жінки можна записати так: 46, XX або 44+XX.

У чоловічому організмі одна X-хромосома. Вона функціонально активна, тому X-статевий хроматин у клітинах чоловіків не виявлено.

У сегментах ядерних лейкоцитів жінок статевий хроматин має вигляд барабанних паличок (**тільця Барра**), у лейкоцитах чоловіків їх немає. Щоб виявити статевий хроматин, можна взяти будь-яку соматичну клітину організму. Але найдоступнішими для цього є клітини букального епітелію слизової оболонки ротової порожнини шпателем беруть і наносять на предметне скло, фіксують, зафарбовують і розглядають під мікроскопом з імерсією.

# ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ



Використані джерела:

1. Путинцева Г.І. Медична генетика : підручник. 2-е вид., перероб. та доп. Київ : Медицина, 2008. 392 с. ISBN 978-966-8144-60-8
2. Запорожан В. М. Та ін. Медична генетика: Підручник для вузів. Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2005. 260 с. ISBN 966-7733-66-1
3. Бужієвська Т.І. Основи медичної генетики. Київ : Здоров'я, 2001. 136 с. ISBN 5-311-01204-8
4. Коджебаш В. Ф. Методичні рекомендації до практичних занять з дисципліни «Медична генетика» для здобувачів вищої освіти спеціальності 222 Медицина / укладач: В. Ф. Коджебаш. Одеса : Університет Ушинського, 2022. 63 с.
5. Помогайбо В.М. Генетика людини : навч. посіб. Київ : ВЦ «Академія», 2014. 280 с.
6. Захаров А.Ф. Хромосомы человека. Москва : Медицина, 1977. 192 с.