АЛЬ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

С.Ж. Колумбаева

А.В. Ловинская

А.М. Калимагамбетов

ГЕНЕТИКАЛЫҚ МОНИТОРИНГТАҒЫ ЦИТОГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘДІСТЕР

Оқу-анықтамалық құрал

Алматы

«Қазақ университеті»

2017

УДК 575.176

ББК

К

*Биология және биотехнология факультетінің және әл-Фараби атындағы РБК ғылыми кеңесінде жариялауға ұсынылған*

**Рецензенттер:**

биология ғылымдарының докторы, профессор Т.М. Шалахметова

биология ғылымдарының кандидаты Б.О. Бекманов

**Колумбаева С.Ж.**

Генетикалық мониторингтағы цитогенетикалық әдістер: оқу-анықтамалық құрал **/** С.Ж. Колумбаева, А.В. Ловинская, А.М. Калимагамбетов. – Алматы: «Қазақ университеті», 2017. – 119 б.

**ISBN**

Оқу-анықтамалық құралда қоршаған ортаның генетикалық мониторингінің теориялық негіздері мен әдістемесі баяндалған. Эукариоттар хромосомаларының құрылымды-функционалды ұйымын цитогенетикалық талдауларға арналған қолданылатын әдіснамалық әдістер ұсынылған. Кітаптың құрылымы мен мазмұны «Биология» «Биотехнология» және «Генетика» мамандығының оқу жоспарына енгізілген «Адамдар мен жануарлардың цитогенетикасы», «Мутагенез негіздері», «Медициналық генетика», «Хромосомалардың құрылымы мен функциялары» дәрістерінің практикалық негіз болып табылады.

Кітап «Биология» және «Биотехнология», «Генетика» білім беру бағдарламасында оқитын студенттерге арналған.

**УДК 575.176**

**ББК**

© Колумбаева С.Ж., Ловинская А.В.,

Калимагамбетов А.М., 2017

ISBN © «Қазақ университеті», 2017

**МАЗМҰНЫ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | | Бет |
| Алғы сөз | | 5 |
| 1-тарау. Қоршаған ортаның генетикалық белсенді факторлары | | 6 |
| 2-тарау. Генетикалық мониторинг | | 14 |
| 2-тарау. Цитогенетиканың ғылым ретінде қалыптасуы мен дамуы | | 17 |
| 3-тарау. Эукариот клеткаларының хромосомалары | | 21 |
| 3.1 | Митоз метафазасындағы хромосомалардың құрылысы мен морфологиялық ерекшеліктері | 21 |
| 3.2 | Хромосома талдауының принциптері және хромосоманы сәйкестендірудің морфологиялық параметрлері | 23 |
| 4-тарау. Мутациялық өзгергіштік | | 27 |
| 5-тарау. Спонтанды және индуцирленген мутагенездегі құрылымның, хромосомалар санының және тұтас геномдардың өзгеруі | | 30 |
| 5.1 | Хромосомалық қайта құрылыс | 31 |
| 5.2 | Хроматидті қайта құрылыс | 36 |
| 6-тарау. Қоршаған ортаны ластаушылардың мутагендік деңгейін анықтауға және бағалауға арналған тест-жүйелер мен тест-объектілер | | 43 |
| 6.1 | Генетикалық мониторинг үшін тест-жүйелерді таңдау критерийлері | 43 |
| 6.2 | Ортаны ластаушылардың мутагендігін анықтау және бағалау үшін тест-объектілер ретіндегі микроорганизмдер | 45 |
| 6.3 | Ортаны ластаушылардың мутагендігін анықтау және бағалауға арналған өсімдік тест-жүйелері | 46 |
| 6.4 | Сүтқоректілер тест-объектілер және жануарлар тест-жүйелер ретінде ортаны ластаушылардың мутагенділігін анықтау және бағалау үшін | 49 |
| 6.5 | Ортаны ластағыштарды анықтауға және бағалауға арналған көп компонентті тест-жүйелер | 53 |
| 7-тарау.Адамның цитогенетикасының негіздері. Адам хромосомаларының жіктелуі мен номенклатурасы | | 55 |
| 8-тарау. Адам хромосомалары препараттарын алудың әдістемелік негіздері | | 61 |
| 8.1 | Біркелкі боялған адам хромосомаларының морфологиясы | 61 |
| 8.2 | Адамның хромосомаларын визуалды сәйкестендіру | 62 |
| 8.3 | Адамның хромосомаларын морфометриялық сәйкестендіру | 64 |
| 8.4 | Метафаза тақтасындағы хромосомалардың кеңістіктік орналасуы | 66 |
| 8.5 | Жеке хромосоманың өзгергіштігі | 67 |
| 9-тарау. Мутагендік факторлардың әсерінен адамның тұқым қуалайтын аурулары | | 69 |
| 9.1 | Аутосома жүйесіндегі сандық бұзылулармен байланысты хромосомалық аурулар | 69 |
| 9.2 | Жыныстық хромосома жүйесіндегі бұзылулармен байланысты хромосомалық аурулар | 71 |
| 10-тарау. Цитогенетикалық зерттеу әдістері | | 73 |
| 10.1 | Микроскоптау | 73 |
| 10.2 | Өсімдік тест-объектілерінде қолданылатын цитогенетикалық әдістер | 73 |
| 10.2.1 | Жоғары өсімдіктер жасушаларынан хромосом препараттарын дайындау және бояу әдістері | 73 |
| 10.2.2 | *Allium*-тест | 77 |
| 10.2.3 | Тозаңды тест | 78 |
| 10.3 | Жануарларды сынау объектілерінде қолданылатын цитогенетикалық әдістер | 80 |
| 10.3.1 | Зертханалық кеміргіштердің сүйек кемігін жасушаларында хромосомалық атерацияны есепке алу үшін цитологиялық препараттарды дайындаудың әдістемесі (метафаза әдісі) | 80 |
| 10.3.2 | Микрокертік сынақ | 81 |
| 10.3.3 | ДНК-комет әдісі (оқшауланған жасушалардың сілтілі гель-электрофорез әдісі)) | 82 |
| 10.3.4 | Тұқым қуалаушылық есепке алу бойынша тест | 86 |
| 10.3.5 | Зертханалық жануарлардағы меиотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерінің құрылымындағы бұзушылықтарды есепке алу әдісі | 88 |
| 10.3.5.1 | Синаптонемальды кешендердің жалпы препараттарын ұрықтың ұлпаларынан алу әдісі | 88 |
| 10.3.5.2 | Миотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерін толық дайындауға арналған бояу әдістері | 90 |
| 10.4 | Адам цитогенетикасының әдістері | 92 |
| 10.4.1 | *In vitro* әдісі адамның перифериялық қанындағы лимфоциттер культурасындағы хромосомалық атерацияны есепке алу әдісі | 92 |
| 10.4.2 | Адамның метафаза хромосомаларын дифференциалды бояу әдістері | 94 |
| 10.4.3 | *In situ* флуоресцентті будандастыру немесе FISH | 103 |
| 10.4.4 | Миотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерінің еркек эякуляты жасушаларынан жалпы дайындық алу әдісі | 108 |
| 11-тарау. Өзін-өзі бақылауға арналған сұрақтар | | 111 |
| Қосымша | | 114 |

**АЛҒЫ СӨЗ**

Хромосомалар көптеген зерттеушілер - генетиктер, цитологтар, биохимиктер, биофизиктер және тағыда басқалары үшін зерттеу нысаны болып табылады.Хромосомалық зерттеулер мақсатты іріктеу үшін маңызды ақпарат береді, сонымен бірге жабайы және мәдени өсімдіктер мен үй жануарларының тұқымдарының спектрін кеңейту сияқты мәселелерді шешуге көмектеседі. Цитогенетикалық әдістер генетикалық мониторингтегіде де кеңінен қолданылады. Өнеркәсіптің қарқынды дамуына және ауыл шаруашылығының химияландырылуына байланысты әр түрлі пестицидтер, минералды тыңайтқыштар, өсу реттегіштері, ауыр металл қосылыстары, радионуклидтер, зымырандық отын компоненттері, бояғыштар, фармакологиялық препараттар, тағамдық қоспалар және т.б. генетикалық бақылау мәселесі туындады. Физикалық және химиялық экологиялық факторлардың өсімдіктер мен жануарлардың хромосомаларының құрылымына әсері цитогенетикалық бақылауда міндетті болып табылады, тест жүйелерінде олардың мутагендік қауіптілігі.

Цитогенетика хромосомалардың құрылымдық ұйымын зерттеуге бағытталған. Хромосомаларды жарық-оптикалық зерттеуде сапалы серпіліс, бояудың жаңа әдістерінің пайда болуы арқасында жасалды, бұл жиынтықтың әр хромосомасына тән метафаза хромосомаларының сызықтық дифференциациясының болуын анықтауға мүмкіндік берді. Бояудың дифференциалды әдістері метафазадағы барлық хромосомаларды анықтауға және монохромды бояумен анықталмаған құрылымдық мутацияларды құруға мүмкіндік береді. Алайда, хромосоманың барлық морфологиялық элементтері нақты анықталған жағдайда монохромды бояу әдісі қазіргі цитогенетикалық зерттеулерде өз маңызын жоғалтпаған.

Оқу құралын генетикалық мониторинг және қоршаған ортаны биоестестинг саласындағы тиісті пәндерді оқыту тәжірибесі бар мамандар дайындаған. Оқу құралының міндеттеріне мутагенез және генотоксикология саласындағы білімдерін толықтыру, сонымен қатар оларды практикалық жұмыста қолдану жатады. Осы нұсқаулықты әзірлеу кезінде авторлар «Биология» және «Биотехнология» және «мамандықтар бойынша оқитын студенттерге , « Адам және жануарлар цитогенетикасы », «Мутагенез негіздері »,«Медициналық генетика»,«Мутагенез және қоршаған орта»,« Хромосомалардың құрылымы мен қызметі» курстарын оқыту тәжірибесін қолданды.

**1-ТАРАУ**

**ҚОРШАҒАН ОРТАНЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ БЕЛСЕНДІ ФАКТОРЛАРЫ**

Соңғы бірнеше онжылдықта байқалатын антропогендік табиғаттың әртүрлі химиялық қосылыстарымен қоршаған ортаның (ҚО) кең ауқымды ластануы әлемде және Қазақстанда қалыптасқан дағдарысты экологиялық жағдайды қиындатады. Әлемнің көптеген елдерінің қоршаған ортада ауыр металдар, пестицидтер, ал соңғы уақытта зымыран отыны сияқты кең таралған ластағыштардың жиналуы халықтың аурушаңдығының өсуіне, биологиялық әртүрліліктің төмендеуіне және табиғи экожүйелердің тұрақсыздануына алып келеді.

Қазіргі уақытта ауыл шаруашылығында, өнеркәсіпте, тұрмыста және медицинада сан алуан жасанды синтезделген химиялық қосылыстар, оның ішінде пестицидтер, тағамдық қоспалар, дәрілік препараттар, бояғыштар, детергенттер және басқа да заттар пайдаланылады, олардың саны мен спектрі жыл сайын ұлғаяды. ҚО ластаушылардың көпшілігі жасушаішілік бос радикалдардың пайда болу процестерін белсендіру, репаративті ферменттік жүйелердің белсенділігін тежеу немесе ДНҚ молекулаларымен тікелей өзара әрекеттесу нәтижесінде тірі организмдерге уытты, канцерогенді, тератогенді және мутагенді әсер етуі мүмкін.

CAS (Chemical Abstracts Service, USA) деректері бойынша 1957-1990 жылдар аралығында 10 млн. химиялық қосылыстар тіркелді, 2008 жылы жалпы тізім 40 млн. құрады, ал 2017 жылдың қазан айында - 130 млн. олардың барлығы ақырында ауада, суда, топырақта және тамақ өнімдерінде болуы мүмкін. Нәтижесінде ағзаға бір уақытта бірнеше ондаған қосылыстар түсуі мүмкін, олар адам тіндерінен немесе басқа ағзалардан табуға болады.

Дүниежүзілік жабайы табиғат қорының деректері бойынша еуропалықтардың денесіндегі химиялық заттардың орташа саны 41, ал ең көп табылған атаулар саны 54, бұл ретте әрбір зерттелген адамнан 13 химиялық қосылыстар табылды. Жүкті әйелдерді тексеру кезінде күн сайын ағзаға түсетін поллютанттардың саны 515-ті құрайды. Жаңа туған нәрестелердің кіндік қанын зерттеу кезінде пестицидтер, диоксиндер, өнеркәсіптік химикаттар, перфтороксиалкилвинил қосылыстары мен бромдалған антипирендерді қоса алғанда, орташа 200 антропогендік химиялық заттар табылды. Келтірілген деректер биосферадағы ксенобиотиктер спектрінің өсіп келе жатқанын және кеңейгенін көрсетеді, бұл генетикалық жүктің ұлғаюына әкеледі және соның салдарынан қандай да бір түрдің жоғалу ықтималдығын арттырады.

Онкологиялық аурулардың 80% жағдайда дамуының негізгі себебі химиялық заттар болып табылады. Бірқатар авторлардың мәліметтеріне сәйкес, көптеген ісіктердің дамуы негізінде генотоксикалық әсерлер жатыр. Сонымен қатар, химиялық қосылыстардың мутагендік және канцерогендік қасиеттерінің корреляциялық тәуелділігі анықталды. Сондай-ақ, қатерлі өсудің пайда болуы мен дамуына белгілі бір гендерде мутациялар жинақталуы себеп болады деп саналады. Бірақ мутагендердің рөлі айтарлықтай кең, сондықтан ұрық жасушаларының мутациялық зақымдануы кездейсоқ түсік пен туа біткен даму кемістіктеріне әкеледі. Жыныстық жасушалардағы мутациялар популяцияда тұқым қуалайтын аурулардың пайда болуына, ал соматикалық жасушаларда – ағзаның ерте қартаюына әкелуі мүмкін.

Қоршаған ортаны ластаушылардың бірі ауыр металдар болып табылады. Ауыр металдар тобына, Асыл және сирек металдарды қоспағанда, атом массасы 50-ден асатын және тығыздығы 5,0 г/см3-ден асатын металдардан тұрады. Оларға қорғасын, мыс, мырыш, никель, кадмий, кобальт, стронций, темір, хром, сүрме, висмут, сынап, қалайы, ванадий, марганец жатады.

Ауыр металдар қосылыстарының тірі организмдерге әсерін зерттеуге көптеген жұмыстар арналған, онда олардың уытты, тератогендік, мутагендік және канцерогендік әсері байқалады. Ауыр металдардың генотоксикалық әсерінің негізгі механизмі ақуыз молекулаларының сульфгидрильді, карбоксильді және Аминді топтарының байланыстырылуы нәтижесінде ферменттік жүйелердің белсенділігін тежеу есебінен жасушаішілік бос радикалдар санының артуымен байланысты.

Қазіргі уақытқа дейін ауыр металдардың уыттылығының тұтас теориясы жоқ. Төмен концентрациялардағы әртүрлі металдардың ұзақ әсер етуі кезінде шалғайдағы генетикалық салдарға қатысты мәселелер жеткілікті әзірленбеген. Басқа химиялық және физикалық факторлармен бірге организмдегі ауыр металдардың әсерлері аз зерттелген.

Басқада кеңінен таралған ҚО ластаушы пестицидтер болып табылады. Ауыл шаруашылығының қарқынды дамуы және пайдаланылатын улы химикаттарға резистентті организмдер зиянкестерінің таралуында пайда болуы пестицидтердің жаңа кластарын өндіруді және қолдануды талап етеді, олар көбінесе мутагендерге ұқсас әрекет етеді. Көптеген зерттеулер адам пайдаланатын пестицидтердің басым бөлігі уытты, тератогендік және мутагендік әсерге ие және химиялық және биологиялық ыдырауға өте жоғары төзімділікке ие екенін көрсетті.ДДСҰ мәліметтері бойынша Тамақ өнімдеріндегі пестицидтермен улану саны жыл сайын 1% құрайды. Өкінішке орай, пестицидтер тек мақсатты түрде ғана емес. Көбінесе препараттардың әсер ету нысаналары табиғи жыртқыштар мен берілетін формалардың паразиттері болады. Алайда экономикалық қажеттілік салдарынан пестицидтерді қолдану сөзсіз.

Тірі организмдер үшін полициклді хош иісті көмірсутектер (ХИК) да белгілі бір қауіп төндіреді. ХИК органикалық заттар толық жанбаған кезде түзілетін барлық жерде атмосфералық ластаушы болып табылады. Қалалық ортадағы антропогендік көздер көлік, әсіресе дизельді жүк машиналары мен автобустар, көмір электр станциялары мен темекі түтін болып табылады. ХИК қоршаған ортаның оны өндіру мен тасымалдау нәтижесінде шикі мұнай түрінде ластануы өте өзекті болып табылады. Жануарлар мен өсімдіктердің көптеген түрлері ХИК-ді шоғырландыруға қабілетті, бұл олардың тамақ өнімдері мен жем-шөптерді ластау мүмкіндігін, демек адам ағзасына түсуді негіздейді. Бірқатар зерттеушілердің көрсеткендегімен көптеген ХИК-тің канцерогенді және мутагенді әсері анықталған.

Ғарыш саласының дамуы қоршаған орта жағдайына теріс әсер ететін жаңа экологиялық қауіпті факторлардың пайда болуына ықпал етеді. Ғарыштық зымырандар полигондарының ұзақ мерзімді жұмысы қоршаған ортаны зымыран отынының компоненттерімен, оның ыдырауы мен жану өнімдерімен ластауға әкеледі. Зымырандық отынмен және оның компоненттерімен ОЖ-ны ластау проблемасы, оның аумағында Байқоңыр ғарыш айлағы орналасқан Қазақстан үшін де өзекті. Бірқатар авторлар зымырандық отынның құрамдас бөліктерінің,мысалы,керосин,1,1-ДМГ,оның диметиламин, тетраметилтетразол, нитросодиметиламин және басқа да улы уытты қосылыстардың төгілуі мен таралуы нәтижесінде халықтың денсаулығы нашарлауда екенін көрсетті.

Cонымен қатар азоттың қосылыстарыда қоршаған ортаға қауіпті ластаушы заттар болып табылады: азот оксиді, нитраттар, нитриттер, нитрозаминдер және басқалары, мутагендік және канцерогенді белсенділігі әртүрлі сынақ жүйелерінде көрсетілген. Азот қышқылының тұздары (нитраттар) қоршаған ортада кеңінен қолданылады, олар биохимиялық қайта құру кезінде азот қышқылының тұздарына (нитриттерге) айналады және екінші аминдермен әрекеттескенде нитрозаминдер береді. Тікелей эксперименттерде бактерияларға арналған мутаген емес диметилнитросамин мутагендердің белсендірілуінің маңызды рөлін көрсететін жоғары ұйымдастырылған түрлерде мутацияны тудырады.

Антропогендік сипаттағы қоршаған ортаны ластаушы заттардың көпшілігінде улы, генотоксикалық және канцерогендік әсері бар екендігі жоғарыда айтылды. Адамзат өмір сүрудің бүкіл кезеңінде табиғи және соңғы онжылдықтарда пайда болған тұқым қуалайтын аурулар деп аталатын генетикалық жүктеме деп аталатын мутациялық процестің арқасында жинақталды, оның жиілігі жыл сайын артып келеді. Адамдардың болашақ ұрпақтарының денсаулығы адамның генофондында қанша теріс мутацияның жиналуына, қазіргі ұрпаққа қандай генетикалық ауыртпалықтың түсуіне байланысты болады.

Есептеулер көрсеткендей, мутациялардың жиілігін екі есе көбейту генетикалық жүктеме мөлшерін ұлғайтып, популяциялар үшін қауіпті болуы мүмкін. Жаңадан пайда болған гендік мутациялардың көпшілігі және барлық дерлік хромосомалық атерациялар жеке адамға да, тұтас популяция үшін де қолайсыз: олар эмбриональды даму кезінде өлімге немесе босанғаннан кейінгі кезеңде әртүрлі ауырлық патологиясына әкеледі. Организмнің өміршеңдігін төмендететін мутация популяцияның генетикалық жүктемесімен байланысты. Популяцияның генетикалық жүктемесінің мөлшері мутация жүктемесінің (жаңадан пайда болатын мутация) және сегрегация жүктемесінің көлемімен (аз бейімделген гомозиготалы генотиптерді бөліп алатын полиморфты (сегрегирленген) локомотивтердің гетерозиготалы генотиптерінің популяциясында болуы) анықталады. Ауыстырмалы жүктер де ерекшеленеді, бұл генотиптің мәні өзгерген кезде анықталады (мысалы, басқа шарттарға көшу кезінде).

Интенсивті ластану жағдайында өздігінен түсік түсіру(аборт), өлі туылу, даму кемістігі бар жаңа туылған нәрестелер саны, қатерлі ісік және т.б. өсуде.Физикалық, химиялық және биологиялық (вирустық) мутагендер болашақта халықтың генетикалық құрылымына елеулі қауіп төндіреді, сондықтан ең өзекті міндеттердің бірі. Мониторинг - бұл адамның генетикалық өзгеру процестерін зерттеу және қолайсыз тенденциялардың дамуын болдырмауға арналған шаралар жүйесін дамыту. Қолданыстағы білімді уақытылы және сауатты пайдалану болашақ ұрпақ үшін денсаулықтың қолайлы деңгейін сақтай алады.

Генетикалық қауіпсіздік мәселесі тек адамдарға ғана емес, сонымен бірге тұтастай биосфераға да қатысты. Кез-келген популяция тек мутацияның белгілі бір ауыртпалығына төтеп бере алады. Мутациялар жиілігінің жоғарылауы генетикалық гомеостаздың бұзылуына және нәтижесінде популяциялар тұрақтылығының төмендеуіне әкеледі.

Биологиялық нысандарға бірнеше мутагендік экологиялық факторлардың жиынтық әсерін зерттеу биосфераның әртүрлі экологиялық қауіпті факторлармен ластануының жоғарылауымен ерекше маңызды болып табылады. Қоршаған ортада химиялық заттар оқшауланған тірі организмдерге әсер ете алмайды. Сондықтан, биосферада организмдер әр түрлі табиғаттағы қоршаған орта факторларының әсеріне ұшырайды.

Көпкомпонентті қоспалардың адамдарға және тұтастай биосфераға әсер етуінің негізгі үш себебі бар. Біріншіден, олар өнеркәсіпте және ауыл шаруашылығында бір уақытта қолданылатын және қоршаған ортаға әртүрлі көздерден енетін көптеген әртүрлі қосылыстардан түзіледі. Сонымен қатар, бастапқы қосылыстардың ыдырау және түрлендіру өнімдері осында болуы керек. Екіншіден, ластаушы заттардың құрамына бірнеше химиялық заттар кіреді. Химиялық өнімдердің көпшілігі әртүрлі агенттердің қосындылары (мысалы, белсенді ингредиенттер, беттік-белсенді заттар, тұрақтандырғыштар, консерванттар және т.б.). Сонымен, күрделі химиялық қоспалар қоршаған ортаға өнеркәсіптік кәсіпорындардан, тазарту құрылыстарынан, полигондардан, сондай-ақ ауылшаруашылық және қалалық аудандардан тікелей енеді. Демек, қоршаған ортаны, оның ішінде генетикалық, қоғамдық денсаулыққа қауіпті бағалаудың шұғыл қажеттілігі туындайды, оны химиялық заттар кешенін қабылдауды білу керек.

Мутагендік әсер ету кезінде генетикалық материалдың зақымдануының модификациясын талдау ДНҚ молекуласының бастапқы бұзылыстары пайда болатын механизм туралы құнды ақпарат бере алады. Мутагенмен емдеуден бұрын немесе кейін модификацияны қолдану генетикалық зақымдануды қалпына келтіруге немесе тұрақты хромосома бұзылыстарына әкелетін қайталама процестердің заңдылықтарын зерттеуге мүмкіндік береді. Химиялық заттардың мутагендік әсері дозаға, генетикалық сипаттамаларға, организмнің даму сатысына, жасына, мутагендерге сезімталдыққа, әсер ету жағдайларына байланысты.

Ультракүлгін және инфрақызыл жарық, сәулелену, температура сияқты әртүрлі физикалық факторлар мутация процесінің өзгерткіштері бола алады. Химиялық факторларға сульфгидрилді препараттар, аминқышқылдары, металл тұздары, ақуыз синтезінің ингибиторлары, ДНҚ мен РНҚ, өсу реттегіштері және басқа заттар жатады. Сонымен қатар, ағзаға кешенді әсер ететін факторлар аддитивті, синергетикалық, сенсибилизаторлық, антагонистік, қорғаныс әсерлерін көрсете алады.

Кейбір авторлар «протекторлар» және «сенсибилизаторлар» ұғымын ағзаға «бұрын» немесе «кезінде» енгізгенде мутация процесіне өзгертуші әсер ететін химиялық заттарға жатқызу керек деп санайды. Мутагендік әсерден кейін модификацияны енгізу қалпына келтіру процесіне әсер етуі мүмкін емдік шаралар ретінде қарастырылуы керек. Бұл әсер оң және теріс әсерлерге ие болуы мүмкін.

Мутация процесінің модификаторларына радиацияны да, химиялық мутагенезді де өзгерте алатын бөлгіш металл иондары кіреді. Көптеген бөлінетін металдар, әдетте, организмдер үшін мутагендер емес, бірақ олардың әсерін әлсірететін немесе күшейтетін көптеген физикалық және химиялық факторлардың мутагендік белсенділігіне айтарлықтай әсер етуі мүмкін. Ca, Cr, Mn, Mg сияқты металдардың тұздарының қорғаныс әсері гамма-сәулеленуге ұшыраған арпа тұқымдарын өңдеу кезінде көрсетілген. Ұқсас нәтижелер басқа авторлармен алынды, алайда бұл зерттеушілер мыс иондарының сәулеленуден бұрын жаздық бидай тұқымына енгізген кезде радиосенсибилизациялық әсерін тапты. Мыстың бұл әрекеті оның ДНҚ молекуласының құрылымын тұрақсыздандыру қабілетіне байланысты.

Суды хлорлау - мутагендер пайда болуымен химиялық заттардың қоршаған ортаға ауысуының ең танымал мысалы. Көптеген авторлар хлордың тұщы да, тұзды да (теңіз) суларына органикалық заттардың көп мөлшері мутагендік қосылыстардың түзілуіне әкелетіндігін тәжірибе жүзінде дәлелдеді. Бүгінгі таңда ауыз суларында жиі кездесетін негізгі мутагендер, канцерогендер және ісік қоздырғыштары анықталды. Хлорланған судың мутагендігі оның құрамындағы органохлорлы қосылыстардың жиынтығымен байланысты, алайда оларды мутагендер ретінде дәл анықтау кейбір жағдайларда қиын.

Ет пен балықты термиялық өңдеу кезінде пайда болатын гетероциклді аминдердің мутагендік және канцерогендік белсенділігі, сондай-ақ олардың метаболизмі зерттелді. Амин қышқылдары мен белоктардың пиридоимидазол, аминокарболин және имидазохинолиннің туындылары анықталды. Бұл қосылыстардың көпшілігі промутагендер екені белгілі. Р-448 цитохромының қатысуымен олар N-гидроксилденуге ұшырайды, ал пайда болған метаболизм өнімдері макромолекулалармен байланыса отырып мутагендік әсерлер береді. Қуырылған және/немесе ысталған өнімдерді алған жануарлар мен адамның көптеген зерттеулерінің нәтижелері несепте және нәжістерде мутагендік қосылыстардың болуын көрсетеді. Тамақ дайындау процесінде мутагендік қосылыстар қоршаған ортада да ұшатын генотоксикалық заттар түрінде пайда болады. Супермутагендердің класына жатқызылған N-нитрозодиметиламин жеткілікті мөлшерде темекі түтінінде, тамақ өнімдерін қақтау және тұздау және оларды алкиламиндер мен нитриттерден термиялық өңдеу кезінде, алкогольдің кейбір сорттарын дайындау кезінде пайда болады. Нитрозодиметиламин синтезі құрамында нитриттер, екінші немесе үшінші аминдер бар тамақ ішкеннен кейін, сондай-ақ кейбір дәрілік препараттарды қолданған кезде адам асқазанының қышқыл ортасында қарқынды жүреді.

Температураның жоғарылауымен темекі түтінінің конденсатының мутагендігі жоғарылайды, ал көмір күлінің жануы өнімдерінің генетикалық белсенділігі 3500 С-қа дейін қызған кезде жоғалады.Сонымен қатар темекі түтінінің конденсаты 2-аминофлуорен, 2-ацетиламинофлуорен, 4-ацетиламинфлуорен және 2-аминоантрацен сияқты полиароматикалық аминдердің мутагендігін арттырады.

Физикалық және химиялық сипаттағы факторлардан басқа қоршаған ортаны ластаушы заттардың үлкен тобы мутагенездің биологиялық факторлары болып табылады. Өсімдік тектес табиғи мутагендердің ішінде цикадтан оқшауланған циказин ерекшеленеді, ол тропикалық және субтропикалық аймақтардағы тағамдарда және халық медицинада дайындау үшін қолданылады.

Төмен және орта мутагенділігі бар табиғи шығу тегінің қосылыстары белгілі. Олардың қатарына колхицин, кофеин, түрлі алкалоидтар және т.б. жатады, кофеин V-нің қытайлық хамстер жасушаларының культурасына әртүрлі химиялық заттарды ұсынатын бірқатар канцерогенді қосылыстардың генотоксичностьтіне әсері зерттелді.Нәтижелері кофеин 2-аминотроценнің, афлатоксиннің генотоксикалық белсенділігін арттырғанын көрсетті. В1, аминометилкуинолин, нитросогуанидин, динитропирол, бенз(а)пирен. Сонымен қатар, кофеин жасуша культурасында 4-(N-метил-N-нитросоамино)-1-(3-пиридил) -1-бутанонмен қоздырылған микроэлектролиттердің жиілігін бірнеше рет төмендеткен. Кофеин химиялық мутагендердің генотоксикалық әсерін модулдей алады.

Флавоноидтардың ішінен кверцетиннің генетикалық әсерлері жақсы зерттелген. Ол көптеген жемістерде, шайларда, қызыл шараптарда және Ptiridium aquillum-де кездеседі. Осыған байланысты әртүрлі тест жүйелерін қолдана отырып, кверцетиннің генотоксикалықтығын зерттеуге көп көңіл бөлінеді. Флавоноидтардың қоршаған ортаға белгілі мутагендік ластану белсенділігіне әсерін зерттеу нәтижелері өте маңызды. Олардың адам ағзасына бірлесіп енуі күнделікті өмірде орын алады. Кейбір флавоноидтар бірқатар заттардың мутагендік белсенділігін төмендететіні белгілі. Сонымен қатар, флавоноидтардың 2-ацетиламинофтореннің мутагендік белсенділігін жоғарылату жағдайлары бар.

Генотоксиканттардың қосындысымен, егер олардың біреуі липофиль болса, мутагендердің сыртқы ортадан ғана емес, сонымен қатар ағзаға тіндік тосқауылдар мен жасуша мембраналары арқылы енуі күшейеді. Мутагендердің әртүрлі токсико-кинетикалық және токсико-динамикалық сипаттамалары осы генотоксиканттардың бірлескен әсеріне жасушалардың әр түрлі реакциясын тудыруы мүмкін (генетикалық нысанада). Егер күрделі қоспалардың кез-келген компоненттері немесе басқа экологиялық фактор генетикалық зақымдау жүйелерін қалпына келтіруге немесе қоздыруға қабілетті болса, тіркелген мутагендік әсер өзгереді.

Жоғарыда айтылғандарға сүйене отырып, қоршаған ортаны генетикалық бақылау қажеттілігі айқындалады. ХХ ғасырдың 70-80 жылдарының аяғында жеке ғылыми сала ретінде пайда болған генетикалық мониторинг қоршаған ортадағы генотоксикалық заттардың пайда болуы мен жинақталуын бағалаудың әдістері мен практикалық әдістерін, олардың мутациялық әсерлерінің спектрін және әртүрлі генетикалық өзгерістерді (мутацияларды) туғызу қабілетін зерделеудің әдіснамасы мен тәжірибелік әдістерін жасауда.

Генетикалық бақылау тірі организмдердің популяцияларындағы генетикалық жүктеменің көлемі мен мазмұнын анықтау мақсатында жүргізіледі. Генетикалық жүктеме дегеніміз теріс (летальдық және сублетальдық) мутациялардың жиналуын білдіреді. Бұл мутациялар гомозиготалы күйге өткен кезде жеке тұлғалардың өміршеңдігінің төмендеуіне немесе олардың өліміне әкеледі.

Соңғы уақытта қоршаған ортаның мутагендік белсенділігі, оның ішінде тірі организмдерде генетикалық өзгерістердің болуы мен көріну дәрежесі сияқты ұғым кең таралды. Популяциялардағы генетикалық өзгерістердің (мутациялардың) сақталу дәрежесі әр ағзаның қорғаныс жүйелерінің тиімділігіне байланысты екені белгілі. Әдетте, жасушаішілік жөндеу жүйелерінің, апоптоздың және иммундық жүйенің жұмысына байланысты теріс генетикалық бұзылыстардың басым көпшілігі жасуша арқылы танылады және жойылады. Алайда ағзадағы спонтанды мутация жиілігінің айтарлықтай артуы стресстің әсер етуінің көрсеткіші болып табылады.

Табиғи экожүйелерге антропогендік қысымның көбеюінен туындаған дағдарыстық экологиялық жағдай, бұрын айтылғандай, кең, кең таралған генетикалық бақылауды қажет етеді. Адамдардың және басқа организмдердің генофондты мутагендік қоршаған орта факторларынан қорғау жөніндегі шараларды әзірлеуге арналған генетикалық өзгерістер туралы алынған ақпарат. Сонымен қатар, бұл мәліметтер олардың зиянды ұзақ мерзімді салдарының алдын алу туралы шешім қабылдауға ықпал етеді.

Генетикалық өзгерістерді ген, хромосомалық және геномдық деңгейде анықтауға болады. Әдебиеттерде биологиялық ұйымның әртүрлі деңгейлеріндегі (микроорганизмдер, өсімдіктер, жануарлар) әртүрлі экологиялық қауіпті экологиялық факторлардың генотоксичность және мутагендік қабілеттерін зерттеуге арналған 100-ден астам тест жүйесі сипатталған. Алайда, тәжірибе көрсеткендей, қолданудың өзектілігін жоғалтпаған цитогенетикалық сынақтарды (метафаза және анафазалық фаза әдістері, микро ядролық сынақ, тозаң әдісі) қоса алғанда, 20-дан көп емес тестілеу жүйелері үнемі қолданылады. Цитогенетикалық анализдің артықшылығы - ол бүкіл геномды сипаттайды және ең сезімтал генетикалық сынақтардың бірі болып табылады. Соңғы жылдары генотоксикологияда ДНҚ-комета әдісі кеңінен қолданылуда, бұл әртүрлі органдардың әртүрлі факторлардың мутагендік әсеріне сезімталдығын анықтауға мүмкіндік береді.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1. Абилев С.К. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие / С.К. Абилев, В.М. Глазер. – М.; СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.

2 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М.: Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.

3 Курляндский Б.А. Общая токсикология / Б.А.Курляндский, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.

4 Артюхов В.Г. Цитогенетический мониторинг состояния окружающей среды на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (на примере пос. Уразово Белгородской области) / В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2006. - Т. 46, № 2.- С. 208-215.

5 Natarajan A. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity / A. Natarajan, P. Molnar, K. Sieverdes, A. Jamshidi, J.J. Hickman // Toxicol. in Vitro. - 2006. – Vol. 20, № 3. - P. 375–381.

6 Holland N.T. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo* / N.T. Holland, P. Duramad, N. Rothman, L.W. Figgs, A. Blair et al. // Mutation Research / G enetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2002. - Vol. 521, № 1-2. - P. 165-178.

**7 Xia X.** The cost of wobble translation in fungal mitochondrial genomes: integration of two traditional hypotheses // BMC Evolutionary Biology. - 2008. - № 8. – Р. 211.

8 Kim K.H. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects / K.H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, Brown R.J.C. // Environment International. – 2013. - Vol. 60. - P. 71–80

9 Актуальная база данных Chemical Abstracts Service (CAS). – режим доступа: http://www.cas.org/.

10 Carpenter D.O. Exposure to Chemicals and Radiation During Childhood and Risk for Cancer Later in Life / D.O. Carpenter, Sh.M.P.H. Bushkin-Bedient // Journal of Adolescent Health. – 2013. – Vol. 52. – Р. S21-S29.

11 Дубинин Н.П. Избранные труды. Т.2. Радиационный и химический мутагенез / Н.П. Дубинин. - М.: Наука, 2000. - 465 с.

12 Дубинин Н.П. Избранные труды. Т.3. Экологическая и космическая генетика. Селекция / Н.П. Дубинин. - М.: Наука, 2001. – 437 с.

**2-тарау. Генетикалық мониторинг**

Адамның шаруашылық қызметінің барлық салаларының қарқынды дамуы нәтижесінде қоршаған ортаға (ҚО) көптеген мутагендік көздер енгізілді және енгізілуде. Бірінші болып рентген сәулелері және алкилдеуші қосылыстар түрінде иондаушы сәулелер пайда болды, мысалы, азотты иприт. Қазіргі уақытта мутагендердің сапалық және сандық құрамы айтарлықтай кеңейді және оларға әртүрлі радиация түрлері және адамның күнделікті өмірінде кеңінен қолданылатын химиялық қосылыстардың түрлі кластары жатады. Радиациялық және химиялық мутагенез бойынша жинақталған тәжірибелік материал генетика мен токсикологиядағы – генотоксикологиядағы жаңа бағытты қалыптастыруға және табысты дамытуға мүмкіндік берді.

Бұл бағыттың негізгі міндеті мутагендердің адам мекендейтін ортасындағы ықтимал генетикалық салдарын бағалау және болжау болып табылады. Генотоксикология саласындағы табыс мутациялардың молекулалық табиғатының іргелі зерттеулерінің дамуына, адам популяциясындағы генетикалық жүктің мониторингі жүйесінің дамуына тікелей байланысты, сонымен қатар қоршаған ортаны ластаушылардың уытты және мутагендік әлеуетін бағалау үшін барабар тест-жүйелер қажет.

ҚО мутагендік факторлармен ластану қаупі анық, өйткені барлық тірі организмдердің, оның ішінде адамның генетикалық материалы зақымданады. Сондықтан генетикалық мониторинг жүргізу қажет, оның міндетіне қоршаған ортада генетикалық материалдың түрлі бұзылуын тудыратын генотоксиканттардың болуын бақылау және мутациялық әсер ету спектрін белгілеу кіреді. Генетикалық мониторинг мутагендік белсенділікке химиялық қосылыстар скринингімен бірге жүргізілуі тиіс. Генетиканың көрнекті ғалымдары – академиктер Н.П.Дубинин және популяциялардың генетикалық мониторингінің негізін қалаушылар болды.

Біздің ғаламшарымызда болып жатқан ресурстар мен процестерді бақылауға арналған бірқатар мемлекеттік және жеке қызметтер бар (жергілікті, аймақтық, ұлттық және халықаралық деңгейде). Мұндай зерттеулер әртүрлі ғылыми-зерттеу және медициналық мекемелерде жүргізілсе де, адамның өзі және организмнің басқа да түрлерінің генофондысын бақылау қызметі жоқ. Соған қарамастан, адам популяцияларындағы генетикалық жүктеменің динамикасына ғаламдық генетикалық бақылау қызметін құру қажеттілігі туындайды.

Генетикалық бақылаудың міндеті - мутациялар санын есепке алу және алдыңғы және кейінгі ұрпақтардағы мутация жылдамдығын салыстыру. Қоршаған ортаның мутагендігінің жоғарылауы мутациялардың жиілігін жоғарылатуға әкеледі, бұл мутация процесін органикалық әлемнің ұзақ эволюциясы аясында қалыптасқан шеңберден тыс қабылдайды. Әр түрлі ағзалар үшін салдары әртүрлі, бірақ адамдар үшін олар ең ауыр болатыны анық.

Пайда болған мутациялардың көпшілігі теріс екендігі белгілі. Популяцияларда онтогенездің әртүрлі сатыларындағы организмдердің өлімі артады, туа біткен кемістіктер саны артады. Мутациялар қысымымен эволюциялық өзгерістер нәтижесінде дағдарыстық жағдай туындайды. Бұл өзгерістер, ең алдымен, мутация жиілігінің артуына себеп болған қоршаған орта мутагендеріне бейімделуге бағытталған. Алайда, мұндай бейімделу популяциядан көптеген генетикалық құрбандарды талап етеді. Эволюцияның бұл түрін эксперименталды түрде Н.П. Дубинин радиоактивті қосылыстардың жоғары фонын құру нәтижесінде (1974). Химиялық мутагендерге мұндай бейімделудің мысалы - бірқатар пестицидтерге төзімді жәндіктер, саңырауқұлақтар, бактериялар және басқалардың нәсілдерінің пайда болуы.Медицинада микроорганизмдердің түрлі антибиотиктерге төзімділігі белгілі.

"Генетикалық дағдарыстан" бұрын көптеген қысқа өмірлік циклі бар, яғни ұрпақтардың жиі ауысуымен және жоғары туумен (R-стратеги деп аталатын) түрлері шығады. Организмдердің барлық түрлерінде генетикалық бейімделу популяциядағы генетикалық құрбандарды іріктеу жолымен алып тастау есебінен болады. Бұл ретте оң мутациялары бар прогрессивті формалардың көбеюі және санының артуы байқалады. Бірақ "генетикалық дағдарыс" жағдайында баяу ауысатын ұрпақтары бар саны аз түрлер жойылуға тиіс. Н.П.Дубининининнің және Ю.В.Пашиннің (1978) тұжырымымен келіспеу қиын, бұл адам үшін табиғи немесе жасанды іріктеу эволюция факторы ретінде өз маңызын жоғалтты. Сонымен қатар, қоршаған ортаның мутагенмен өсіп келе жатқан ластануы жағдайында адам популяциясының генетикалық бейімделуі мүмкін емес. Қазір біз тұқым қуалайтын патологиялар жиілігінің ұлғаюын байқап отырмыз, бұл болашақ ұрпақ үшін негізді алаңдаушылық тудырады. Сондықтан генетикалық мониторинг жүргізуі маңызды.

Адам популяциясындағы жаңа мутацияларды анықтау мақсатында генетикалық мониторинг жүргізу кезіндегі қиындықтар, біріншіден, генетикалық ерекшеліктердің алуан түрлілігімен;екіншіден,осы популяциялармен жеткілікті генетикалық жүктің жиналуымен байланысты. Бұл мутациялар гомозиготалық жағдайға өтіп, адамдардың өміршеңдігін олардың өлуіне дейін айтарлықтай төмендетеді.

Қазіргі уақытта экожүйелер мен оның компоненттерінің жай-күйін биотестілеуді жүргізу үшін бірнеше жүздеген тест-жүйелер әзірленді. Тест-объектілер мен тест-жүйелер сезімталдық, ақпараттылық және технологиялылық сияқты қасиеттерге ие болуы тиіс. Бұдан басқа, генетикалық скринингте пайдаланылатын биологиялық тест-жүйелер бірқатар талаптарға жауап беруі тиіс, оның ішінде:

- мутацияның барлық түрлерін аңықтау қабілеті- гендік, хромосомалық, геномдық;

- төмен дозаланған мутагендердің әсерін анықтауға мүмкіндік беретін жоғары сезімталдық пен нақтылық;

- нәтижелердің экспрессивтілігі, арзандығы және репродукциясы;

- промутагендерді, яғни жұтылған кезде метаболикалық активация нәтижесінде мутагендік белсенділік көрсететін заттарды анықталуы;

- басқа организмдерге генетикалық қауіпті сандық бағалау нәтижелерін экстраполяциялау.

Әрине белгілі тест жүйелерінің бірде-біреуі жоғарыда аталған барлық генетикалық сынақтарға жауап бере алмайды. Сондықтан, әдетте олар генетикалық белсенді факторларды сынаудың бір сатылы түрін немесе тестілер батареясын пайдаланады. Көбінесе генетикалық мониторинг жүргізу кезінде ген мутацияларын анықтау үшін тесттер қолданылады (бактериалды зерттеулер, дрозофиладағы өлім және рецессивті мутацияны индукциялау тестілері және т.б.); ДНҚ зақымдану индукциялық сынақтары (құйрықты сынау, жоспардан тыс ДНҚ синтезін талдау); адамдарда және сүтқоректілерде соматикалық жасушаларда хромосомалық абразиялардың индукциясына тесттер, сондай-ақ сүйек кемігінің жасушаларында микроэлементтер); *in vitro* жасуша трансформациясы сынағы немесе модельді жануарларда ісік индукциясы).

Цитогенетикалық тесттер барлық геномның жағдайын сипаттайтын болғандықтан маңызды мүлік екенін атап өту қажет. Цитогенетикалық зерттеулер генетикалық белсенді факторлардың әсерін бағалауда кеңінен қолданылады. Құрылымдық қайта құрулар метафазада және митоздың анафазасында талданады. Соңғы уақытта бір объектіде бірнеше критерийлерді жиынтық пайдалану ұсынылады. Мұндай тәсіл тест-жүйенің сезімталдығын айтарлықтай арттыруға мүмкіндік береді. Цитогенетикалық мониторинг жүргізу кезінде неғұрлым объективті бағалау үшін митотикалық белсенділіктің тежелуі; патологиялық митоздар, оның ішінде көп полюсті; микроядролар сияқты көрсеткіштерді ескеру қажет.

Қорытындылай келе, популяцияның генетикалық мониторингінің нәтижелері қоршаған ортада мутагендердің құрамын төмендету және биоценоздарды қорғау жөніндегі іс-шараларды өткізу үшін маңызды көрсеткіш болып табылатынын атап өту қажет.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Дубинин Н.П., Пашин Ю.В. Мутагенез и окружающая среда / Н.П.Дубинин, Ю.В. Пашин. - М.: Наук, 1978. – 130 с.

2 Абилев С.К. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие / С.К. Абилев, В.М. Глазер. – М.; СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.

3 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М.: Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.

4 Артюхов В.Г. Цитогенетический мониторинг состояния окружающей среды на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (на примере пос. Уразово Белгородской области) / В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2006. - Т. 46, № 2.- С. 208-215.

**3-ТАРАУ**

**ЦИТОГЕНЕТИКАНЫҢ ҒЫЛЫМ РЕТІНДЕ ҚАЛЫПТАСУЫ МЕН ДАМУЫ**

Генетика - тұқым қуалаушылық және өзгергіштік заңдылықтарын зерттейтін ғылым. Цитогенетика - тұқым қуалаушылық пен өзгергіштіктің цитологиялық негіздерін зерттейтін генетика саласы. Экстрахромосомалық (цитоплазмалық) тұқым қуалаушылықты зерттейтін клетка генетикасы да ерекшеленеді.

Цитогенетика хромосомалардың құрылысы мен қызметін зерттейді. Ол генетика, цитология әдістерін қолданады және молекулалық генетика, цитохимия, кариология және басқа ғылымдармен тығыз байланысты. Классикалық цитогенетикалық анализде, әдетте, бір уақытта хромосомаларды цитологиялық (микроскопиялық) зерттеу және белгілердің тұқымқуалаушылық генетикалық анализі жүргізіледі.

Цитогенетика ХІХ және ХХ ғасырлардың арасында пайда болды. Цитогенетика тарихы шартты түрде үш кезеңге бөлінеді: бірінші кезең - XIX ғасырдың соңы және ХХ ғасырдың алғашқы жиырма жылдығы; екінші кезең - ХХ ғасырдың екінші онжылдықтың аяғынан 60-шы жылдарға дейін ; үшінші кезең - ХХ ғасырдың 60-жылдардың аяғынан бастап қазіргі уақытқа дейін.

Бірінші кезең цитогенетиканың негізгі мазмұнын құрайтын тұқым қуалаушылықтың хромосомалық теориясының пайда болуы мен негіздемесін қамтиды. Цитогенетиканың теориялық негізі-тұқым қуалаушылықтың хромосомдық теориясы (американдық ғалымдар Э. Вильсон, В. Сеттон және неміс ғалымы Т. Буери, 1901-1903 жж.). Хромосоманың болып табылады материалдық тасығыштармен тұқым қуалаушылық, ашық Ж. Менделем. 1909 жылы бұл тұқым қуалайтын ақпарат тасушылар Дат ботанигі В. Иогансен арқасында гендер деп аталды. Цитогенетика термині алғаш рет 1903 жылы В.Сеттон енгізілді.

Хромосома теориясының қазіргі ережелерін Т.Морган және оның мектебі дамытқан. Негізгі ережелері:

* гендік байланыс топтарының белгілі бір жұп хромосомаларға сәйкестігі;
* хромосомалардың жеке құрылымының тұрақтылығы;
* мутациялық өзгерістерді мұра ету;
* митоз және мейоз механизмдерімен қамтамасыз етілген кариотип түрінің тұрақтылығы (хромосомалар жиынтығының морфологиялық белгілері);
* хромосомалардағы гендердің сызықтық орналасуы және олардың мейоз кезіндегі гомологты хромосомалар арасындағы рекомбинациясы.

Бұл ережелер қазіргі уақытта терең зерттелетін цитогенетиканың негізгі мәселелері мен бағыттарын анықтайды.

Цитогенетиканың дамуының екінші кезеңі - бұл негізінен өсімдіктер, жануарлар және адамдар хромосомаларының микроскопиялық (жарық микроскопиясы) және субмикроскопиялық (электронды микроскопия) деңгейлері. Митоздық хромосомалардың морфологиясын зерттеу және хромосомалардың жұптарының құрылымдық сәйкестілігін белгілеу, хромосомалардың жеке басының морфологиялық принципінің негізділігі С. Навашин, Г.А. Левицкий және Л.Н.Делаунай еңбектерінде анықтама берілген. Бұл кезең хромосомалардың әмбебап екі қолды құрылымының ашылуымен, гетерохроматиннің және хромосомалардың басқа да мамандандырылған аймақтарының (нуклеолар-ұйымдастырушы, кинетохор) морфологиясы мен қызметін қарқынды зерттеумен сипатталады. Бұл уақытта метафаза хромосомасының ультраструктурасы электронды микроскопия, алып ДНҚ молекулалары мен интерфаза хроматинінің көмегімен белсенді зерттелді. Электрондық және жарық-оптикалық микроскопия көмегімен хромосомалардың мейоздағы түрленуі және кесіп өтудің құрылымдық негіздері бойынша зерттеулер жүргізілуде. ХХ ғасырдың 50-ші жылдары сондай-ақ шам щеткалары сияқты политенді хромосомалар мен хромосомаларды, транскрипция кезіндегі хромосомалардың жеке бөлімдерінің құрылымын зерттеу негізінде хромосомалардың функционалды морфологиясының пайда болуымен сипатталады. Автографиялық әдісті (J. Н. Taylor) цитогенетикада қолдану жеке бағытты дамытуға мүмкіндік берді - матрицалық ДНҚ синтезінің негізінде хромосома көбеюін зерттеу.

Цитогенетикадағы зерттеулердің негізгі бағыттарының бірі Т.Морган бастаған хромосомалардың генетикалық картаға түсуі. Картографиялаудың мақсаты - әртүрлі биологиялық түрлердің хромосомаларының генетикалық карталарын жасау. Рентген сәулесінің хромосомаларға әсерін зерттеу индукцияланған мутагенезді зерттеуді бастады. Хромосомалардың құрылымдық қайта жіктелуі жасалды, мутациялардың пайда болу ерекшеліктері мен механизмдері және олардың генетикалық әсерлері анықталды (В.В. Сахаров, М.Е. Лобашев, И.А. Рапопорт, Н.П. Дубинин, Н.Н. Соколов, Б.Н.) .

1920 ж организмдердің геномдық өзгергіштігін зерттеудің басталуымен сипатталады, яғни жиынтықтағы хромосомалар санының өзгеруі немесе тұтас біртұтас жиынтықтар санының өзгеруі - полиплоидия (М.С. Навашин, Г.А. Левицкий, Г.Д. Карпеченко, А.Н. Лутков). Бұл зерттеулер табиғи спецификациядағы геномдық вариацияның рөлін және өсімдіктер мен жануарлар тұқымдарының жаңа формалары мен сорттарын жасанды түрде жасауды зерттеудің негізін қалады.

С. Г. Навашиннің мен оның шәкірттері Г. А. Левитскийдің, Л. Н. Делоне мен М. С. Навашиннің еңбектері өсімдік хромосомаларының жұқа морфологиясы бойынша жұмыстары цитогенетикада – кариосистематиканың тағы бір бағытын дамытуға және биологиялық түрлердің эволюциялық қалыптасуындағы хромосомалардың (олардың санының, формасының және жалпақтылығының өзгеруі) өзгеруінің рөлін анықтауға ықпал етті.

1920 ж. Бастап С.Г. Навашин және Н.Кольцов мектебінің кеңестік цитогенетикасы өсімдіктер мен жануарлардың жүйелік бірліктерін кеңінен хромосомалық зерттелуі басталды. Кейінгі жылдары бұл зерттеулерді М.Дж. Уайт, Р.Мэтти және басқалар жалғастырды.Осы бағытта цитогенетика бір түрдің жеке адамдарындағы хромосомалардың жеке өзгеруін де зерттейді.

Цитогенетика тарихындағы үшінші кезеңді (1960 жылдардың аяғынан бастап қазіргі кезге дейін) цитогенетикада молекулалық зерттеу әдістерін қолдану арқасында молекулалық-цитогенетикалық деп сипаттауға болады.

Хромосоманың құрылымын және оның функцияларын анықтауда молекулярлық тәсілдеме туралы алғаш хабаршылар:

-Н.К. Кольцованың гипотезасы хромосомалардың молекулалық құрылысы және көбеюі туралы (1927-1928). Бұл гипотезаға сәйкес, хромосоманың негізін түпнұсқа молекулалық матрицадан өз көшірмесін автокаталитикалық құру арқылы өздігінен көбеюге қабілетті күрделі ұйымдастырылған сызықтық макромолекула құрайды;

-жасуша ядросының негізгі биологиялық макромолекулаларын - ақуыздар, ДНҚ және РНҚ-ны цитохимиялық анықтау (1930 жж.);

-фотометрия мен спектрофотометрияны қолдана отырып, жасушалық құрылымдардағы ДНҚ мен РНҚ құрамын сандық зерттеу (1940 жж.);

- нуклеин қышқылдары мен ақуыздардың биохимиясы мен физикалық химиясын дамыту, физикалық химия, аналитикалық және дайындық биохимия әдістерімен хромосомалар мен жасуша ядроларының химиялық құрамын зерттеу (А.Н. Белозерский, А.С. Спирин, Г.П. Георгиев, И.Б. Збарский, Е. Chargaff, А.Е. Mirsky, D. Davidson, Ph.A.Th. Levene, W.Т. Astbury және т.б.);

-ДНҚ молекуласының кеңістіктік құрылымын Ф.Крик пен Дж.Уотсонның ашуы (1953), содан кейін генетикалық кодтың химиялық табиғаты қазіргі молекулалық генетиканың пайда болуына негіз болды..

Молекулалық генетиканың дамуы цитогенетика үшін маңызды әдіснамалық тәсілдерді жасауға мүмкіндік берді:

* геномның жалпы ДНК және ДНҚ-ны жеке хромосомалармен немесе интерфазалық ядро учаскелерін фракциялау және фрагменттеу;
* бактериялық жасушаларда ДНҚ фрагменттерін клондау және көбеюі;
* ДНҚ молекуласының фрагменттеріндегі бастапқы нуклеотидтер тізбегін анықтау;
* нуклеин қышқылдарын ерітінділерде, сүзгілерде және цитологиялық препараттарда хромосомада гибридизациялау.

Жоғарыда келтірілген тәсілдердің барлығы хромосомалардың транскрипция, репликация, кесіп өту кезіндегі рекомбинация, хромосомаларды қайта құру және ДНҚ зақымдалуын қалпына келтіру, хромосомалардың митоздық конденсация-деконденсациялану сипаты және басқа да құбылыстарын молекулярлық деңгейде түсіндіруге мүмкіндік берді.

1980 жылдардың басынан жеке хромосомалар мен олардың аймақтарын тікелей молекулалық картаға түсіру әдістері қолданыла бастады (ең алдымен адам цитогенетикасында). Ағзалардың туысқан түрлеріндегі ерекше және қайталанатын нуклеотидті ДНҚ тізбегін салыстырмалы зерттеу қарқынды түрде жүргізілуде. Тұқым қуалайтын аурулар санының көбеюіне байланысты адам цитогенетикасы одан әрі дамыды.

Зерттеу жиынтығының жеке хромосомаларын және олардың жеке бөлімдерін анықтау мақсатында митотикалық және мейоздық хромосомалардың морфологиясы саласында белсенді жүргізілуде.

Адамның цитогенетикасы 1956 жылдан бастап, адам клеткаларында 46 хромосома бар екендігі анықталғаннан кейін дами бастады (X. Тио және А. Леван). 1959 жылы Дж. Лежюн Даун синдромының пайда болуының цитогенетикалық картинасын алғаш рет ашып, 1963 жылы мысықтың айқай синдромын сипаттады. 1959 жылы Даун ауруы, Шерешевский-Тернер синдромы мен Клайнфельтер ауруының себебі хромосомалар санының нормадан ауытқуы екендігі анықталды.

Хромосомалық аурулардың ашылуынан кейін клиникалық цитогенетика қарқынды дамыды, хромосомалардың туа біткен кемістіктердің этиологиясы мен патогенезіндегі рөлін, жыныстық дамудың бұзылыстарын, қатерлі ісіктерді және т.б.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Пухальский В.А. Практикум по цитологии и цитогенетике растений / В.А. Пухальский, А.А. Соловьев, Е.Д. Бадаева, В.Н. Юрцев. – М.: КолосС, 2007. – 198 с.

2 Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки / К. Босток, Э. Самнер. – М.: Мир, 1981. – 598 с.

3 Смирнов В.Г. Цитогенетика. / В.Г. Смирнов. – М.: Высшая школа, 1991. – 247 с.

4 Атабекова А.И. Цитология растений / А.И. Атабекова, Е.И. Устинова. – М.: Агропромиздат, 1987. – 246 с.

5 Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с.

6 Бочков Н.П. Клиническая генетика: учебник / Н.П. Бочков, В.П. Пузырев, С.А. Смирнихина; под ред. Н. П. Бочкова. — 4-е изд., доп. и пере- раб. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 592 с.

7 Основы цитогенетики человека / под ред. Прокофьевой-Бельковской А.А.. – М.: Медицина, 1969. – 544 с.

8 Ньюссбаум Р.Л., Мак-Иннес Р.Р., Виллард Х.Ф. Медицинская генетика: учеб.пособие / Р.Л. Ньюссбаум, Р.Р. Мак-Иннес, Х.Ф.Виллард; пер. с англ. А.Ш. Латыпова; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.

**3-ТАРАУ**

**ЭУКАРИОТ КЛЕТКАЛАРЫНЫҢ ХРОМОСОМАЛАРЫ**

**3.1 Митоз метафазасындағы хромосомалардың құрылысы мен морфологиялық ерекшеліктері**

Цитогенетика зерттеулерінің негізгі тақырыбы - хромосомалар, олардың оранласуы, жұмыс істеуі және тұқымқуалаушылығы.

*Хромосомалар* (аудармасы - боялған денелер) - көптеген тірі организмдерде, соның ішінде адамдарда ұрпақтан ұрпаққа берілетін тұқым қуалайтын ақпарат тасымалдаушылары. Хромосомалар жасуша бөлінуінің басында интерфаза ядросының *хроматинінен* түзіледі (1-сурет).

1-сурет –Эукариот клеткасындағы хромосомалардың құрылысы ( И.Н. Пименова бойынша, 2003)

Хроматин белоктармен байланысқан ДНҚ молекулаларынан тұрады, ол электронды микроскопта анық көрінеді. Бұл жіптер бірінен соң бірі орналасқан микробөлшектерден - диаметрі 10 нм болатын нуклеосомалардан тұрады. Нуклеосомада белоктың бел омыртқасы болады, оның айналасында ДНҚ молекуласы бұралған.

Өмір циклі кезінде хромосома жасушалары белгілі бір өзгерістерге ұшырайды. Клетка циклінің өтуімен хромосомалар ұзындығын өзгертеді. Әрбір хромосома өзінің жеке формасы мен генетикалық құрылымына ие. Хромосомалардың саны мен құрылымы организмнің түріне байланысты.

Хромосомалардың морфологиясын зерттеу хромосомалар тығыз күйде болған кезде метафаза тақталарында жүргізіледі. Метафаза сатысында әр хромосоманың жеке сипаттамаларын есептеу және зерттеу оңай. Митоздық хромосомалардың морфологиясын зерттеу, әдетте, жарық микроскопының көмегімен ядролық бояғыштармен боялған цитологиялық препараттарда жүргізіледі.

Соматикалық жасушалар ядроларына тән белгі - жұптасқан хромосомалар: әр хромосома ядрода өзінің гомологына ие. Организм бір гомологты анадан, ал екіншісін әкеден алады.

Белгілі бір мөлшерде және морфологиямен сипатталатын белгілі бір түрдің соматикалық клеткасының хромосомаларының жиынтығы кариотип деп аталады. Соматикалық клеткалық диплоид жиынтығы 2n, ал герпелді жасушаларға тән гаплоид жиынтығы n деп белгіленеді. Сонымен қатар негізгі сан ерекшеленеді - х-мен белгіленетін полиплоидты түрлердің пайда болуының негізі болатын хаплоидтардың бастапқы гаплоидты жиынтығы. Полиплоидты түрлердегі хромосомалар саны негізгі саннан бірнеше есе көп. Мысалы, *Triticum* (бидай) тұқымында 2n=14 (бір қара бидай), 2n=28 (қатты бидай), 2n=42 (жұмсақ бидай) түрлері белгілі. Әр түрлі бидай түрлерінің хромосомалық жиынтықтарының барлық саны негізгі х=7

*Хромосомалардың сандық сипаттамалары.* Хромосомаларды дәл анықтау үшін хромосомалардың ұзындығы мен иықтарының ұзындығын өлшеу үлкен маңызға ие. Алынған сандық деректерді білдіру үшін келесі үш параметрді қолдану әдеттегі болып табылады:

1. 1. Абсолютті хромосома ұзындығы, мкмен көрсетілген (LА);
2. Хромосоманың салыстырмалы ұзындығы - Х хромосомасы бар қалыпты гаплоид жиынының барлық хромосомаларының жалпы ұзындығына қатысты хромосома ұзындығы, промилледе көрсетілген (LR);
3. Қысқа қол ұзындығының хромосоманың бүкіл ұзындығына қатынасы ретінде көрсетілген центромериялық индекс (IC).

Хромосомалардың пішінін анықтауда хромосома денесін екі қолға бөлетін центромера аймағының (бастапқы тарылу) маңызы зор. Бұл аймақтың орналасуы қатаң тұрақты және хромосомалардың негізгі үш түрін анықтайды (Levan et al., 1964):

- метацентрлік (ұзындығы бірдей немесе дерлік тең иық, центромерикалық индекс IС =50-38%);

- субметацентрлік (ұзындығы тең емес иық, центромерлік индекс IС =38-25%);

- акроцентрикалық (бір иық ұзын, екінші қысқа, центромерлі индекс IС =25-12%).

Бірқатар хромосомаларды ұйымдастырудың тән белгісі екіншілік тарылудың болуы (2-сурет). Екінші тарылу әдетте хромосоманың соңына жақын орналасады және кішкентай спутниктік денемен аяқталады. Спутниктік хромосомалардың саны мен құрылымы кариотипке тән, сондықтан спутниктік хромосомалар жиынтықтағы басқа хромосомалардың арасында ерекше орын алады. Белоктары бар ДНҚ-ны хроматин деп атайды. Хромосома бойынша эухроматин және гетерохроматин аймақтары ерекшеленеді.

1 - метацентрлік; 2 - субметацентрлік; 3, 4 – акроцентрикалық; 5 - центромера; 6 – екіншілік тарылу; 7 - спутник; 8 - хроматидтер; 9 – теломералар

Рис. 2 - Строение хромосомы. (по И.Н. Пименовой, 2003)

Ағзалардың генетикалық ақпараты жазылған негізгі субстрат хромосомалардың эухроматиндік аймақтары болып табылады. Эухроматин ДНҚ (гендер) молекулалық құрылымының өзгеруі генетикалық ақпараттың жаңа формаларының пайда болуына әкеледі. Хромосомаларды дифференциалды бояу әдістерінің дамуымен өсімдіктер мен жануарлардың барлық дерлік түрлерінде эвроматин мен гетерохроматинді аймақтарды ажыратуға мүмкіндік туды..

**3.2 Хромосома талдауының принциптері және хромосоманы сәйкестендірудің морфологиялық параметрлері**

Кариотиптік талдау кезінде келесі талаптарға жауап беретін 10-15 метафазды пластинкаларды зерттейді: клеткалар бір қабатта орналасуы тиіс; препарат берілуге тиіс емес; хромосомалар бір жазықтықта орналасқан және жапсырмалар құрмайтын пластинкаларды таңдау қажет. Кариотиптеу хромосомалық жиынтықты жүйелендіруден басталады, оның негізінде хромосомаларды есептеу және гомологиялық жұптардың бөлінуі. Жұмыс метафаз пластиналарының фотопленкаларынан оң таңбаларда жүргізіледі.

Хромосомаларды дәлірек анықтау және метафаза плиталарын салыстырмалы бағалау үшін жоғарыда аталған хромосомаларды өлшеуге негізделген морфометриялық критерийлер қолданылады.

Хромосомалардың ұзындығын өлшеу метафазалық тақталардың микрофотографиясында жүргізіледі. Хромосома ұзындығы - оның хроматидтерінің орташа ұзындығы. Иықтың ұзындығы центромера аймағының ортасынан өлшенеді. Егер хроматидті иықтар бүгілсе, онда нүктелер өлшеу оқулары жасалынатын орталық бойлық ось бойымен белгіленеді. Иықтың ұзындығы фильтрсіз спутниктік және спутниктің өзінде қарастырылады. Өлшеуді бағалау миллимметрлік қағазда жасалады.

*Үлкен ұқсастықтықтығын жүйелеу тәсілі.* Үлкен ұқсастық әдісі бірінші жуықтау ретінде таңдалған метафазалардың әрқайсысының хромосома жиынтығын жүйелеуге мүмкіндік береді және кариотипті жіктеудің бастапқы кезеңін білдіреді. Әрбір хромосома қайшымен кесіліп, оның барлық жағынан 1-2 мм шеті қалады (хромосоманың бөліктерін кесіп алмау үшін). Жүйелеу алдымен хромосомаларды өлшемі бойынша, морфологиясы бойынша топтарға, ақыры ұқсастық әдісімен гомологтық жұптарға бөлуден басталады. Әр жұп сериялық нөмірді алады және метацентриктердің, субметацентриктердің және акроцентриктердің өлшемдеріне сәйкес қатарға орналастырылады. Жұпталған және нөмірленген хромосомалар қағазға бірнеше жолмен желімделіп, центромера аймақтары тураланады. Ұзындығы мен морфологиясы бойынша ұқсас хромосомалар кариотиптік топтарға топтастырылған. Сонымен қатар парақта метафазалық пластинаның қысқартылған түрдегі бүкіл фотосуреті орналасқан..

*Кариограммалық талдау.* Кариограммалық талдау көзбен ұқсас хромосомаларды сәйкестендіру үшін қолданылады. Кариограмма-бұл кариотиптің графикалық бейнесі. Кестедегі нүктелердің орналасуы осы жеке кариотипте сандық өлшемдер бойынша хромосомалардың нақты бөлінуін көрсетеді. Абсцисс осі бойынша графикада хромосомалардың салыстырмалы ұзындығы (Lr), ординат - центромерлік индекс (Ic ) осі бойынша кейінге қалдырылады. Бірнеше метафазды пластиналардың морфометриялық сипаттамалары бойынша жасалған Жиынтық кариограмма полиограмма деп аталады (сурет. 3).

a – *V. articulate Honem;* b – *V. benghalensis L.*

3-сурет – 15 метафазды тақталар бойынша поликариограмма (В.Д. Турков бойынша, 1988)

Полиограммада хромосомалардың басым жиналу аймақтары (нүктелер түрінде) көрсетіледі, олар жақын морфометриялық көрсеткіштері бар қандай да бір кариотиптік топты білдіреді. Алайда, бұл әдіс хромосомалар жеке жиынтықта жақын сандық сипаттамалары болған жағдайда кариотиптік талдау жүргізуге мүмкіндік бермейді. Бұл көптеген хромосомалар мен олардың әлсіз морфологиялық бөлшектенуі бар кариотиптерге жатады.

*Идиограммалық талдау.* Белгілі бір түрдің бірнеше хромосома жиынтығын морфометриялық талдау әрдайым бірдей метафаза тақтасында болсада, гомологты хромосомалардың абсолютті және салыстырмалы ұзындығындағы кейбір өзгергіштігін көрсетеді. Бұл шамалардың орташа көрсеткіштерін алу үшін идиограммалар табылады. «Идиограмма» термині бірнеше жасушалардың өлшеулеріне негізделген диаграмма түрінде құрылған кариотипке қатысты қолданылады, онда хромосомалар олардың ұзындығына, сондай-ақ басқа да құрылымдық белгілеріне қарай нөмірленеді (4-сурет).

а – (2n=14); б – (2n=28); в – (2n=42); г – (2n=56)

4-сурет - Әртүрлі плоидты бидай идиомограммасы ( В.Д. Турков бойынша, 1988)

Идиограмма жасау кезінде дифференциалды бояу әдісі арқылы анықталған әрбір хромосоманың жұптасуының сызбасы ескеріледі (5-сурет).

5-сурет - Хромосомалардың дифференциалды G-бояуы сызбалық бейнесі (46, XY) ( А.Ф. Захаров бойынша, 1982)

Осы идиограммалардың негізінде адамдардың, сүтқоректілердің және өсімдіктердің хромосомалары жинақталған.растений.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Босток К. Хромосома эукариотической клетки / К. Босток, Э. Самнер. – М.: Мир, 1981. – 598 с.

2 Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Новосибирское университетское изд. 2007. - 479с.

3 Турков В.Д. Хромосомные исследования растений в проблемах селекции, клеточной инженерии и генетическом мониторинге: Атлас-пособие. / В.Д. Турков, Ю.Л. Гужов, Г.А. Шелепина, Я.Ш. Кишмария, Д.Г. Кометиани– М.: Изд-во УДН, 1988. – 64 с.

4 Пименова И.Н.Лекции по общей биологии: учеб. пособие / И.Н. Пименова, А.В. Пименов. - Саратов: Лицей, 2003 (ГУП Сарат. полигр. комб.). - 206 с.

5 Захаров А.Ф. Хромосомы человека: Атлас АМН СССР / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина, 1982. – 264 с.

**4-ТАРАУ**

**МУТАЦИЯЛЫҚ ӨЗГЕРГІШТІК**

Көбею кезінде генетикалық материалдың өзіндік ерекшелігін сақтайтын тұқым қуалаушылықтың консерватизмі тұқым қуалайтын өзгерумен қатар жүреді және оған қарсы болады, яғни генетикалық материалдың ұрпақта мұра болып қалған өзгерістерге ұшырау қабілеті. Ағзалардың тұқым қуалайтын өзгергіштігінің екі түрі ажыратылады - комбинациялық және мутациялық.

Комбинациялық өзгергіштіктің негізі әр түрлі аллельдер болатын гендердің, хромосомалардың және олардың сегменттерінің рекомбинациясы процесі болып табылады. Комбинациялық өзгергіштіктің нәтижесі ұрықтандыру кезіндегі кездейсоқ үйлесудің нәтижесінде және кесіп өту нәтижесінде ата-аналарына қарағанда аллельдердің жаңа комбинациясы болатын ұрпақтар ағзаларының алуан түрлілігі болып табылады.

Мутацияның өзгеруі гендердің және / немесе хромосомалардың тұрақты өзгеруінен болады. Бұл өзгерістер тұқым қуалайтын белгілердің сапалы өзгеруіне әкеледі. Оларды іріктеуге болады, бірақта популяцияда қала алады немесе жойылады.

«Мутация» терминін алғаш рет ХХ ғасырдың басында жарияланған голландиялық ботаник Гуго де Фриз өзінің «Мутация теориясы» классикалық еңбегінде ұсынған. Бұл теорияның негізгі ережелері әлі күнге дейін маңыздылығын жоғалтпаған. Оның айтуынша, мутация кенеттен, өздігінен, өтпестен пайда болады; олар үнемі көрініс табады және тұқымқуалаушылыққа жатады. Мутация пайдалы, зиянды немесе бейтарап болуы мүмкін. Мутацияны анықтау талданатын адамдардың санына байланысты. Дәл осындай мутациялар төмен жиілікте болса да, бірнеше рет пайда болуы мүмкін.

Мутация - тұқым қуалайтын материалдағы дискретті, тұрақты өзгерістер, бұл фенотиптің өзгеруіне әкеледі. Мутацияның пайда болу процесі мутация немесе мутагенез деп аталады. Мутагенез термині көбінесе индукцияланған мутацияға қатысты қолданылады. Мутация нәтижесінде жаңа белгілер пайда болған организм фенотиптің өзгеруіне әкеліп соқты мутант деп аталады.

Алғаш рет органикалық әлемде үнемі жалғасатын мутациялық процесс теориясын С.И. Коржинский, көрнекті орыс ғалымы, академик, Санкт-Петербург университетінің ботаникалық бағының директоры. 1899 жылы оның «Гетерогенез және эволюция» атты кітабы Ресейде басылып шықты, ол кейіннен неміс тіліне аударылып, 1901 жылы Германияда жарық көрді, сонда Гуго де Фриз мутация процесінің теориясының негізгі принциптерін С. И. Коржинский «Мутация теориясы» жұмысында.

Көптеген іргелі мәселелерді шешу үшін генетиктер мутациялардың табиғаты мен жиілігін білуі керек. Мутациялар - адамның тұқымқуалаушылық ауруларының негізі. Сондықтан мутация процесін, оның заңдылықтарын, механизмдерін, мутацияны тудыратын факторларды, мүмкін болатын салдарды егжей-тегжейлі зерттеу қажет. Демек, тұқым қуалайтын патологияның алдын-алу мәселесін, кем дегенде, ішінара мутацияның пайда болу механизмін түсіндіру арқылы ғана шешуге болады.

Мутацияның жіктелуіне әртүрлі көзқарастар бар. Бастапқыда мутациялар белгілі материал генетикалық материалға ұшыраған кезде пайда болатын өздігінен пайда болатын және туындайтын болып бөлінеді. Гетерозиготалы күйде көрінуімен ерекшеленетін доминантты және рецессивті мутациялар бар. Мутация бағытында олар тікелей және кері болып бөлінеді. Мутацияның бірінші түрі жабайы типтің күйін сапалық жағынан басқа күйге ауыстырады. Екінші тип немесе кері мутация (реверсия) мутантты күйді жабайы типке қайтарады.

Мутациялар сонымен қатар аллельдердің көріну күшіне байланысты жіктеледі. Гиперморфты, гипоморфты, неоморфты, аморфты және морфқа қарсы түрлері ажыратылады. Гиперморфты мутациялар геннің әрекетін өзі басқаратын өнімнің синтезін жақсарту арқылы күшейтеді. Гипоморфты мутациялар, керісінше, жабайы типтегі аллельмен кодталған синтезделген биохимиялық өнім мөлшерінің төмендеуіне байланысты геннің әсерін әлсіретеді. Морфикалық емес мутация жабайы типтегі аллельдің басқаруымен синтезделгеннен өзгеше өнім синтезін кодтайды. Аморфты және антиморфты мутацияларға келсек, біріншісі геннің әрекетін белсенді етеді, ал соңғысы жабайы типтегі аллельдерге қарсы әрекет етеді. .

Мутациялардың жіктелуі олардың өміршеңдігіне және / немесе ұрықтылығына әсер етуі тұрғысынан да маңызды. Бұл аспект бойынша мутация өлімге жіктеледі, бұл дененің өліміне әкеледі; дененің тіршілігін репродуктивтік жасқа дейін сақтап қалуға немесе басқаша айтқанда, оларды алып жүретін адамдардың жартысының қайтыс болуына әкелетін жартылай өлім; шартты түрде өлім, кейбір жағдайларда адамдардың қайтыс болуына әкеледі, ал басқаларында өміршең болып қалады; стерильді, қалыпты өміршеңдік кезінде құнарлылықты төмендетеді; организмнің өміршеңдігі мен құнарлылығына әсер етпейтін бейтарап мутациялар. Ықтималдылық бірдей қоршаған орта жағдайындағы екі үлгінің өмір сүру деңгейін сандық сипаттайды, ал ұрықтылық - ағзалардың өмірге қабілетті ұрпақ әкелу қабілеті. Әдетте, ұрықтандыру ұрпақты болу кезеңінде пайда болған бір әйелдің ұрпағының санына байланысты анықталады.

Көрініс табиғаты бойынша мутациялар морфологиялық, физиологиялық, мінез-құлықтық (этологиялық), биохимиялық және басқаларға бөлінеді. Дегенмен, мұндай бөлу өте еркін, өйткені барлық белгілер биохимиялық негізге, физиологиялық механизмге және морфологиялық өрнекке ие. Мутациялар сонымен қатар ауыспалы генетикалық материалды - цитоплазмалық (митохондриялық, пластидті) және ядролық локализация үшін ерекшеленеді.

Тұқымның пайда болу орны мен тұқымқуалаушылығы сипатына негізделген тағы бір жіктеу - мутациялардың генеративті және соматикалық болып бөлінуі. Генеративті мутациялар ұрық жасушаларында пайда болады және тұқым қуалайды. Жұмыртқада немесе ұрықта болатын мутация бірыңғай болады. Оогенездің немесе сперматогенездің алғашқы сатысында пайда болатын мутация өткен жасушаның бөліну санына пропорционалды мөлшерде көбейеді. Болашақта жетілген ұрық жасушаларының бір бөлігі мутантты аллельді алып жүреді, ал жетілген ұрық жасушаларының басқа бөлігінде өзгермеген генотип болады. Соматикалық жасушаларда, жыныстық жасушалардан айырмашылығы, жыныстық көбею ағзаларында мозаика / химералардың пайда болуына әкелетін немесе тұқым қуалайтын, бірақ асексуалдық көбеюі бар организмдерде соматикалық мутация пайда болады.

Сонымен, өзгермелі генетикалық материалды ұйымдастыру деңгейіне негізделген мутацияның тағы бір жіктелуі - бұл гендік хромосомалық және геномдық мутацияға бөліну. Дәл осы жіктеуді осы нұсқаулықтың кейінгі бөлімдерінде қарастырамыз.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1. Абилев С.К. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие / С.К. Абилев, В.М. Глазер. – М.; СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.

2 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / [С.А. Гераськин, Е.И. Сарапульцева, Л.В., Цаценко и др.]; под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М. Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.

3 Генетика / Под ред. Иванова В.И. М.: ИКЦ "Академкнига", 2006. - 638 с

4 Natarajan A. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity / A. Natarajan, P. Molnar, K. Sieverdes, A. Jamshidi, J.J. Hickman // Toxicol. in Vitro. - 2006. – Vol. 20, № 3. - P. 375–381.

5 Holland N.T. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo* / N.T. Holland, P. Duramad, N. Rothman, L.W. Figgs, A. Blair // Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2002. - Vol. 521, № 1-2. - P. 165-178.

**6 Xia X.** The cost of wobble translation in fungal mitochondrial genomes: integration of two traditional hypotheses / **X.** **Xia** // BMC Evolutionary Biology. - 2008. - № 8. – Р. 211.

7 Дубинин Н.П. Избранные труды. Т.2. Радиационный и химический мутагенез / Н.П. Дубинин. - М.: Наука, 2000. - 465 с.

**5-ТАРАУ**

**СПОНТАҢДЫ ЖӘНЕ ИНДУЦИРЛЕНГЕН МУТАГЕНЕЗДЕГІ ҚҰРЫЛЫМНЫҢ, ХРОМОСОМАЛАР САНЫНЫҢ ЖӘНЕ ТҰТАС ГЕНОМДАРДЫҢ ӨЗГЕРУІ**

Хромосоманың өзгеруіне әкелетін факторлар өте алуан түрлі. Хромосомалық өзгерістердің себептері түсініксіз болған кезде олар өздігінен немесе табиғи деп жіктеледі. Көп жағдайда олар жасуша алмасуының бұзылуынан болады.

Хромосомалық зақым келтіретін әсерлердің ішінде бірінші кезекте иондаушы сәулелер (рентген және гамма-сәулелер) және ультракүлгін сәулелер (ультракүлгін сәулелер) болып бөлінетін сәулелену болып табылады. Хромосомалық зақым бірқатар химиялық қосылыстардың әсерінен де болады. Алкилирлеуші ​​заттар - электрофильді қосылыстар, оларда электрондардың тығыздығының жоғарылау орталықтарымен өзара әрекеттеседі. Химиялық мутагендік факторлардың әсер ету механизмінің принциптеріне сәйкес тоғыз негізгі кластар бөлінеді: 1) алкилдеуші медиандар; 2) пероксид; 3) альдегидтер; 4) гидроксиламиндер; 5) азот қышқылы; 6) антиметаболиттер, соның ішінде ДНҚ негіздерінің аналогтары; 7) ауыр металдардың тұздары; 8) негізгі қасиеттері бар бояғыштар; 9) бірқатар басқа заттар, негізінен хош иісті қатарлар (кейбір дәрілік заттар, алкалоидтар, пестицидтер, соның ішінде инсектицидтер, гербицидтер, дефолианттар және т.б.).

Хромосомалық зақымданудың барлық түрлерін мутация ретінде анықтауға болады. *Хромосомалық мутациялар* - бұл хромосома аймақтарының қосылуында, жоғалуында немесе қайта орналасуында көрінетін құрылымдық өзгерістер. Хромосомалық мутациялар жарық микроскопының астында митоздық хромосомаларда айқын көрінеді, ал молекулалық деңгейде пайда болатын ген мутациялары биохимиялық әдістермен немесе белгілі бір биохимиялық реакциялар нәтижесінде пайда болатын фенотиптік өзгерістерді зерттеуде анықталады. Мутацияның барлық түрлерінің ішіндегі ең көп тарағаны - бұл жарық микроскопында анықталмайтын ген мутациясы.

Хромосомалар санының өзгеруі полиплоидия құбылыстарында (диплоид санының екі немесе одан да көп есеге артуы), анеуплоидиямен (бір немесе бірнеше хромосомамен белгіленген хромосоманың азаюы немесе жоғарылауы) көрінеді. Полиплоидты жасушалардың пайда болуы митоздың анафазасындағы хромосомалардың қарама-қарсы полюстерге қозғалуын қамтамасыз ететін бөлімнің шыбықтарының дисфункциясымен байланысты. Нәтижесінде хромосомалар санынан екі есе көп жасушалар пайда болады.

*Хромосомалардағы құрылымдық өзгерістер.* Хромосомалардың құрылымдық мутацияларының екі негізгі түрі бөлінді - бұл хромосома типті аберрация және хроматидті аберрация. Осы түрлердің әрқайсысында айырмашылықтың басты критерийі қайта бөлудің центромералардың таралуына қатынасы болып табылады.

Мутагендік факторлардың әсерінен туындаған хромосомалардың қайта құрылуының жиілігі мен түрлерін бірінші митозда зерттеу керек, мұнда дамып келе жатқан құрылымдық мутациялар барлық категориялары ұсынылған, өйткені кейінгі митоздарда центромеральды аймақтар жоқ хромосомалардың бөліктері, сондай-ақ екі немесе одан да көп центромерлері бар хромосомалар (асимметриялық қайта құрылымдар) жоғалды.

Қолайсыз эндогендік және экзогендік факторлардың әсерінен хромосома құрылымында бір немесе бірнеше бұзылулар пайда болады. Бұл жағдайда алынған хромосомалардың фрагменттері әртүрлі конфигурациялардың (құрылымдық қайта құрылу) тіркесімін құра отырып, біріге алады. Алайда митоз жағдайында бір центромеральды аймақты құрайтын және бөліну кезінде полюстерге таралуы мүмкін хромосомалардың бөліктері ғана қалыпты жұмыс істей алады.

**5.1 Хромосомалық қайта құрылыс**

Хромосома типті қайта құрылымдау жасуша циклінің синтетикалық кезеңінде (G1), хромосома бір ДНҚ тиімді тізбегімен ұсынылған кезде болады. Митоз метафазасында олар жасуша циклінің синтетикалық фазасында (S) туындайтын аберрацияны екі есе арттырғаннан кейін, екі хроматидте де гомологиялық түзілістер түрінде көрінеді. Бұл типтегі түзілімдер хромосомадағы қарапайым үзілістің нәтижесі болуы мүмкін, оның ДНҚ синтезі кезінде жұптасқан терминалдың жойылуы (жұпталған фрагменттер) екі есе жоғарылағаннан кейін пайда болады. Егер екі немесе одан да көп хромосомада немесе бір хромосомада бір реттен көп үзіліс болса, онда алмасу түзулері пайда болады: интрахромосомалық - центрлік және ацентрлік сақиналар, интерстициальды жою және инверсия; интерхромосомалық - центрлік және полицентрлік хромосомалар (центрлік және полицентриктер), симметриялы алмасулар.

*Жұптық шеткі делециялар.* Буланған гомологичные ацентрические фрагменттері пайда болып, ажырау кезіндегі хромосомалардың да G1-фазасында пайда болады иықтың ацентрический фрагменті және проксимальный фрагменті с центромерой, олар екі еселенеді S-фазасында жасушалық цикл (6-сурет).

а-потенциалды өзгеріс пайда болған(крест) центромері бар бастапқы хромосома (шеңбер); б – центрикалық (1) және ацентрикалық (2) фрагменттің пайда болуы; в – ДНҚ синтезінен кейінгі құрылымның екі еселенуі; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

6-сурет – Жұптық шеткі делециялар (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Асимметриялы хромосомды транлокациялар (алмасулар).* Бұл түрге дицентриктер мен полицентриктер жатады. Дицентрикалық хромосомалар екі гомологиялық немесе негомологиялық емес хромосомалар арасындағы бөліктердің бөлінуі мен алмасуы нәтижесінде пайда болады. Орталық және ацентрикалық фрагменттердің пайда болуы хромосомалардың әрқайсысында жалғыз ажыраудан кейін болады. Екі центромерлік фрагменттерді екі хромосмадан біріктіру бір дицентрикалық хромосоманың (екі центромерлік учаскесі бар хромосома) пайда болуына әкеп соғады. Екі ацентрикалық учаске әдетте бір жалпы фрагментке құйылады. Жасушалық циклдің S-фазасында ДНҚ молекулаларының репликациясы орын алады және митоздың метафазасында дицентрикалық хромосома екі центромер орнында байланысқан екі дицентрикалық хроматидтермен және гомологиялық фрагменттердің буымен ұсынылған (7-сурет).

a – екі фрагментке бөлінген,яғни центрлік(1;3) және ацентрлік(2;4) фрагменттерге бөліндірілген потенциалдық өзгеріс(крест) пайда болған екі алғаш центромералары бар (шеңберлер) хромосомалар; b - центрлік (1; 3) және ацентрлік (2; 4) фрагменттер; c - екі центрлік фрагменттердің бір фрагментте центрлік хромосома мен ацентриялық фрагменттердің пайда болуымен ұштасуы; d - S фазасындағы центрлік хромосома мен акцентрлік фрагменттердің автоматты түрде көбеюі;S; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

7-сурет – Ассиметриялық хромосоманың транслокациясы - дицентрлік хромосома (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

Полицентрлік хромосомалар центрлік хромосомаларға ұқсас қалыптасады, бірақ соңғыларына қарағанда проксимальды центрлік фрагменттерге қосымша бір немесе бірнеше интерстициалды центрлік кірістіру қажет (8-сурет).

*Симметриялық хромосомалық транслокациялар (алмасулар).* Қайта құрылымдаудың бұл түрімен гомологиялық және гомологиялық емес хромосомалар арасында алмасу жүреді. Алайда, асимметриялық транслокациялардан айырмашылығы, алмасу центромералардың жеке хромосомаларға қарағанда таралуына әсер етпейді. Симметриялы хромосома транслокациясында бір хромосоманың центромеральды фрагменті басқа хромосоманың акцентрлік фрагментімен үйлеседі. Бұл алмасу G1 фазасында жүреді және репликациядан кейін бір центромермен байланысқан екі хроматидте де симметриялы хромосома транслокациясы ұсынылған. Сонымен қатар, қайта құрылған хромосоманың әр хроматиді әртүрлі хромосомалардың гендік блоктарын біріктіреді (9-сурет). Симметриялы хромосомалық транслокациялары бар хромосомалар асимметриялық алмасуы бар хромосомалардан айырмашылығы, бірқатар жасуша ұрпақтарында құрылымдық бұзылыстардың мұрагер болуын қамтамасыз ететін митоздан өтуі мүмкін.

а – потенциал өзгерістер болған үш бастапқы хромосомалар; b - центрлік фрагменттердің (4; 6), интерстициалды центрлік фрагменттердің (2) және ацентрикалық фрагменттердің (1; 3; 5; 7) түзілуі; c - центрлік және ацентрлік фрагменттердің үш центрлік хромосоманың және екі түрлі фрагменттердің пайда болуымен байланысы; g - ДНҚ репликациясынан кейін құрылымды екі есе арттыру;G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

8-сурет – Асимметриялық хромосомалық транслокация - полиментрлік хромосома (Л.Г. Дубинина бойыша, 1978)

a - әр хромосоманы екі бөлімге бөлетін потенциал өзгерістері бар алғаш екі хромосомалар; b - центрлік (2; 3) және ацентрлік фрагменттер (1; 4); c - басқа хромосоманың ацентрлік фрагментіне центрлік фрагментті бекіту (2.4 және 3.1), олардың әрқайсысында жаңа центромера орналасуы бар екі хромосоманың пайда болуына әкеледі; g - ДНҚ репликациясы, екі хроматидтер түрінде қайта құрылған хромосомалардың пайда болуы; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

9-сурет – Симметриялы хромосомалы транслокациялар (Л.Г. Дубининой бойынша, 1978)

*Инверсиялар.*Бұл түрдегі перестройка екі үзілістің және хромосоманың ішкі бөлігінің 1800 өтуінің нәтижесінде пайда болады. Парацентрлік және перицентриальды инверсиялар ажыратылады. Бірінші жағдайда, хромосоманың бір қолында, центромераға әсер етпей, айналуы болады. Алайда, мұндай инверсияны жарық-оптикалық микроскопиямен монохромды бояу әдісі арқылы анықтау мүмкін емес. Бұл жағдайда инверсиясы бар хромосоманы дифференциалды бояу әдісі арқылы ғана анықтауға болады. Перицентриальды инверсия нәтижесінде инверттелген аймаққа центромеральды аймақ кіреді (10-сурет).

Егер инверттелген аймақтың шекаралары центромерден әр түрлі қашықтықта болса, онда хромосома морфологиясы да өзгереді, бұл жарық микроскопында анық көрінеді. Хромосомада перицентрлік инверсияны қалыптастыру үшін центромераның екі жағында екі үзіліс қажет. Алынған центрлік фрагмент 1800 ауысады және ацентрлік фрагменттермен біріктіріледі. Қайта реттелген хромосома жаңа центромера құрылымымен түзіледі. Инверсиялық хромосомаларда барлық генетикалық материал сандық жағынан сақталады, алайда ДНҚ молекуласындағы нуклеотидтер тізбегі бұзылғандықтан оның сапалық сипаттамалары өзгереді. Төңкерілген хромосомалар әдетте митоздан өтіп, бірнеше жасуша буындарында сақталады.

а - бастапқы субтелоцентристік хромосомада екі бастапқы зақымдану пайда болды;

b - ішкі центромералды бөлім 180-ге бұрылып, ацентрлік фрагменттермен байланысқан; c - центромера жаңа позицияға ие болды - хромосома метацентрге айналды; г - синтезден кейін ДНК; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

10-сурет – Инверсия (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Сақиналы хромосомалар.*Бұл құрылымдық ауытқулар тұйық түрінде сақиналы хромосомаларда анықталады. Сақиналы хромосомалардың екі түрі бар - центрлік және ацентрлік. Аберрацияның осы екі түрінің негізгі айырмашылығы - сақинада центромераның болуы немесе болмауы. Центрлік сақина бастапқы хромосоманың әр түрлі иықтарындағы саңылаулар мен сақинадағы фрагменттің центромерін қамтитын ішкі (интерстициалды) жабылу нәтижесінде пайда болады. Бұл жағдайда бір ацентрлік фрагментті құрайтын терминал (дистальды) фрагменттер қосылады. Ацентрлік сақина центромерден ерекшеленеді, оның құрамында центромерлер болмайды. Ацентрлік сақиналар, сондай-ақ ацентрикалық фрагменттер митоз кезінде жойылады, содан кейін ферменттер лизиске ұшырайды (11, 12- суреттер).

а - бастапқы хромосомадағы екі ықтимал өзгеріс; б - хромосома үш бөлікке бөлінді; c - ішкі центромеральды фрагмент центрлік сақинаға жабылады, дистальды ацентрлік фрагменттер бір фрагментті біріктіреді; d - ДНҚ репликациясынан кейін центрлік сақина, сондай-ақ ацентрикалық фрагмент екі еселенеді; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

11-сурет – Центрическалық сақиналар (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

а - екі потенциалдық өзгерісі бар бастапқы хромосома; b - центрлік (1), интерстициалды (2) және центрлік (3) фрагменттер; in - ішкі интерстициалды фрагмент сақинамен жабылған; g - ДНҚ репликациясынан кейін; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

12-сурет – Ацентрикалық сақиналар (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Микрофрагменттер(нүктелік фрагменттер).*Бұл жасуша циклінің G1 фазасында бастапқы фрагмент түрінде пайда болатын жұптастырылған түзілімдер. Микрофрагменттің мөлшері (нүкте фрагменті) оның қалыптасуы ол пайда болған хромосоманың мөлшері мен морфологиясын көрнекі түрде өзгертпейді. Кейбір микрофрагменттер шағын жұпталған терминалды жою, ал басқалары - микро интерстициальды жою нәтижесінде пайда болатын микро сақиналар.

**5.2** **Хроматидті қайта құрылыс**

Құрылымдық аберрацияның бұл түрі бір немесе екі хроматидтен тұратын хромосомаларда кездеседі (кеш фаза, G1-фаза және митоздың алдын алу). Хромосома түріндегі сияқты, хроматидті қайта бөлу де жою және айырбастау арқылы ұсынылады. Алайда, хромосома түрлерін қайта орналастырумен салыстырғанда, хроматидтік қайта түзулер түрлерінің саны көбірек. Хроматид түрін қайта құру кезінде, әдетте, қалыптасқан фрагменттердің біріктірілуі болмайды.

*Хроматидті шеткі делециялар.*Бұл құрылымдық хромосоманың аберрациясы хроматидтің біртектес жыртылуы нәтижесінде пайда болады, олар бастапқы хромосомадан шығарылып, қарындас хроматидтің екінші жағында орналасуы немесе хроматидтің жыртылу кезеңінде тұрған орынды иеленуі мүмкін (13-сурет). Соңғы жағдайда зақымдалған хромосоманың центрлік және центрлік фрагменттері арасындағы қашықтықтың аздығына байланысты хроматидті жою терминалын hep-ден ажырату қиын.

*Изохроматидті делециялар.*Құрылымдық аберрацияның бұл түрі екі гомологиялық про-ксималдық (центромерамен қосылған) және екі ацентрикалық дистальды фрагменттердің түзілуімен мейірбикелік хроматидтерде гомологиялық рет-жұлқулар нәтижесінде пайда болады. Изохроматидті делециялардың төрт түрі болуы мүмкін, олардың түзілуі тең ықтимал: қосылыссыз (а); проксимальды және дистальды сегменттердің қосылысуы (b); дистальды (с) қосылыстар болған кезде проксимальды қосылыспауы; проксимальды және дистальды фрагменттердің қосылысуы (d) (14-сурет).

Изохроматидті делециялар кезінде фрагменттердің қосылу жиілігі объектінің ерекшелігіне байланысты және жасушалық циклдің S-фазасы мен G2-фазаларының әртүрлі сатыларында өзгереді. Цитологиялық изохроматидті ажыраулар (фрагменттердің қосылуынсыз) хромосомдық шеткі делециялардан бөлінбейтінін атап өткен жөн. Сондықтан көптеген авторлар хромосомалық шеткі делециялар мен фрагменттердің қосылысынсыз изохро-матидті ажыраулар хромосомалардың құрылымдық бұзылыстарының жеке түріне – изолокустық ажырауларды бөледі.

*Асимметриялық хроматидтер алмасуы (хроматидтік дицентрлар).* Аберрацияның бұл түрі екі хроматидтен проксимальды фрагменттердің араласуы нәтижесінде пайда болады (15-сурет). Дистальды фрагменттердің синтезі жалпы фрагменттердің пайда болуына әкеледі. Хромосомалардың қайта орналасуының осы түрін қалыптастыру үшін әр түрлі хромосомалардан екі хроматидте бір рет үзіліс жасау қажет. Кейде күрделі хроматидтік алмасуға екіден көп хромосома қатысуы мүмкін.

а - бастапқы хромосома; b - ДНҚ синтездегеннен кейін хроматидтердің бірінде ықтимал өзгеріс болды; c - хроматидтің центрлік (1) және центрлік (2) бөліктерге бөлінуі; g - метафаза сатысында хроматидтердің жойылуы;G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

13-сурет - Хроматидті шеткі делеция (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

а - бастапқы хромосома; b - ДНҚ репликациясынан кейін хромосома, апалы-хроматидтердің гомологиялық локалиясында мүмкін өзгерістер болды; c - хромосома екі бөлікке бөлінді: центрлік (1, 3) және центрлік (2, 4); г- ж - центромеральды және ацентрлік фрагменттердегі хром-қалқанша безінің мүмкін комбинациясы;G1, S, G2 – клеткалық бөліну фазалары

14-сурет – Изохроматидті делеция (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Симметриялы хроматидті алмасулар.*Ұқсас хроматидті транслокациялар түрлі хромосомалардан центромеральды аймаққа ие болмайтын хроматид бөліктерінің алмасуынан болады. Сонымен қатар центромерлы аймақтарға ие, бірақ әртүрлі хромосомалардан гендік блоктарды біріктіретін екі толыққанды хромосома пайда болады (16-сурет).

*Сақиналы интерстициалды хроматидті сақиналар.* Хромосоманың бір қолының бір хроматидінің ішінде қос жарылыс нәтижесінде интерстициалды фрагмент пайда болады, ол ұштарымен хроматидтік сақинаға жабылады.

а – екі бастапқы хромосомалар; б - әр хромосоманың бір хроматидінде бір потенциал өзгеріс пайда болды; c - хроматидтердің әрқайсысында центрлік және акцентрлік фрагменттердің пайда болуы; г - екі хроматидтің центромеральды фрагменттерін центрлік хроматидтер (хроматидтік дицентрлер) түзумен байланыстыру, сонымен бірге ацентрикалық фрагменттер де біріктіріледі; д - метафазадағы асимметриялық хроматид алмасуы, G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

15-бойынша – Асимметриялы хроматидті транслокация (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

а – екі бастапқы хромосомалар; б – потенциалды өзгерісті таситын хроматидтер; в –центрикалық және ацентрикалық фрагменттердің құрылуы; г – бір хромосоманың ацентрикалық фрагментінің басқа хромосоманың ацентрикалық фрагментіне қосылуы (сурет метафазада), G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

16-сурет – Симметрия хроматидті алмасу (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

Зақымдалған хроматидтің дистальды және проксимальды бөліктері қосылған кезде бір қысқартылған хроматидпен қайта реттелген хромосома пайда болады (17-сурет). Сақина сегментінің мөлшері әр түрлі болуы мүмкін, бірақ, әдетте, ол кішкентай және интерстициалды жою ретінде белгіленеді.

а – бастапқы хромосома; б - хроматидтің репликацияланған хромосомаларының біреуінде екі мүмкін өзгеріс; в - хроматид үш бөлікке бөлінеді: терминальды центрлік (1), ішкі (2) және терминальды ацентрлік (3); г - қысқартылған хроматидтің пайда болуымен центрлік және акцентрлік соңғы бөліктерді қосу, ішкі фрагмент сақина түрінде жабық; д - метафазадағы интерстициалды жою, G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

17-сурет – Сақиналы интерстициальды хроматидті делеция (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Изохроматидті интерстициальды сақиналар.* Бір хромосоманың екі мейірбикелік хроматидтерде екі изохроматидті ажыраулар пайда болған кезде екі ішкі гомологиялық учаскелер сақинаға тұйықталады, ал проксимальды және дистальды учаскелер қосылыстардың әртүрлі формаларына ұшырауы мүмкін (18-сурет).

*Хроматидті интерстициальды дупликация-делеция.* Аберрацияның бұл түрі бір хроматидте интерстициалды жойылу пайда болғанда және апалы-қарындастық хроматидте бір жыртылу пайда болады. Жыныс орнында интерстициалды сегменттің ену хроматидіне енуі және оның туыстық хроматидтің проксимальды және дистальды бөлімдерімен байланысы генетикалық материалдың қайталануына (екі есеге) алып келеді. Интерстициалды сегменті жоқ хроматидтің проксимальды және дистальды бөліктерін қосқан кезде қысқартылған хроматид пайда болады. Осы рекомбинация нәтижесінде қайтадан ретке келтірілген хромосома пайда болады, онда бір хроматидте қайталану және апалы-хроматидтік терминалдың жойылуы жүреді (19-сурет)

*Ахроматикалық зақымданулар* (саңылаулар, кеңістіктер, жарықтар). Бұл хроматидтегі тар саңылаулар, олар біртекті (апалы-сіңлілі хроматидтердің біреуінде локализацияланған) және қосарлы болуы мүмкін (изолокустық сипатқа ие, яғни екі апалы-хроматидтің гомологиялық орындарында кездеседі). Бүгінгі таңда геповтың табиғаты туралы нақты түсінік жоқ. Мүмкін, бұл нағыз олқылықтар немесе жарық микроскопымен жазылған хромосомалық ауытқулар болуы мүмкін және ДНҚ-ның жергілікті дезапиризациясы және осы аймақтың нашар бояуы болуы мүмкін. Алайда, қазіргі кезде зерттеушілердің көпшілігі цитогенетикалық талдау жүргізу кезінде гептерді ескеріп, оларды бөлек бағанға орналастырады.

а –бастапқы хромосома; б - екі изохроматидті потенциалдық өзгерістер; в - үш жұп гомологиялық фрагменттердің пайда болуы: проксимальды (1, 4), дистальды (3, 6) және ішкі (2, 5); г – қосылыстардың үш-бес түрі - екі біріктірілген ішкі фрагменттердің сақинасы болған кезде дистальды және проксималды фрагменттердің қосылыстары емес, з - проксимальды және дистальды фрагменттердің қайта қосылуы арқылы жойылған хромосоманың пайда болуы, G1, S, G2 – клеткалық бөліну фазалары

18-сурет – Изохроматидті интерстициальды сақиналар (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Хромосомалық хроматидтердің қайта орналасуы.*ДНҚ-ның репликациясы процесінің асинхрондылығына байланысты, жасуша циклінің S-фазасында орналасқан хромосомада, мутагендік факторға ұшырауы мүмкін ДНҚ-ның біржақты және қос ішекті бөлімдері болады. Нәтижесінде хромосоманың бір бөлігі хромосома түрін қайта бөлуді қалыптастыруға қатысады, ал екінші бөлігі хроматидті қайта құрылымдауды қалыптастыруға қатысады (20-сурет).

а – бастапқы хромосома; б - репликациядан кейін хроматидтердің біреуінде бір мүмкін өзгеріс, ал екіншісінде екі өзгеріс болды; в - хроматидтер фрагменттерге бөлінеді; г - басқа хроматидтің центрлік және акцентрлік фрагменттерінің арасына бір хроматидтің ішкі фрагменті салынған; d - метафазадағы конфигурация, G1, S, G2, M клеткалық бөліну фазалары

19-сурет – Хроматидті интерстициальды дупликация – делеция (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

а - бастапқы хромосомалар, олардың біреуінде дистальды ұшынан бастап, ДНҚ синтезі басталды (3, 4, ішінара 2 бөлім), ол екі хроматидтен тұратын репликация шанышқымен бейнеленген; хромосоманың қалған бөлігі жұмыс істемейді, G1 фазасына жатады; б - перестройканың қалыптасуына қатысатын фрагменттер; 3, 4, 2 фрагменттері изохроматидтің жыртылуы кезінде пайда болды, 1, 5, 6, 2 фрагменттері хромосомалық жарықтар нәтижесінде пайда болды; c - 1 және 5 бөлімдерді біріктіру центрлік хромосоманы құрайды; 6, 2 - сынған хроматидтердің ұштарының қосылуымен хромосомалық хроматидті фрагмент; 3-4 - біріктірілген акрентикалық фрагменттер; g - хромосомалық хроматидтердің метафазада қайта орналасуы; G1, S, G2, M – клеткалық бөліну фазалары

20-сурет - Хромосомды-хроматидті қайта құрылу (Л.Г. Дубинина бойынша, 1978)

*Көптеген хромосомалық зақымданулар.* Химиялық мутагендердің жоғары концентрациясын немесе радиацияның жоғары дозаларын жасушада қолдану кезінде көптеген хромосомалық зақымданулар пайда болады. Екі немесе үш хромосомалық аберрациялар пайда болған кезде оларды анықтау қиын емес. Алайда, көптеген зақымданулармен құрылымдық ауытқуларды анықтау мүмкін емес. Экстремалды көрінісі пульверизация болып табылатын хромосомалардың жаппай бөлінуі оның құрылымының толық жойылуын білдіреді.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Дубинина Л.Г. Структурные мутации в опытах с *Crepis capillaris* / Л.Г.Дубинина. – М.: «Наука», 1978. – 188 с.

2 Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Новосибирское университетское изд. 2007. - 479с.

3 Смирнов В.Г. Цитогенетика / В.Г. Смирнов. – М.: Высшая школа, 1991. – 247 с.

4 Ньюссбаум Р.Л. Медицинская генетика: учеб.пособие / Р.Л. Ньюссбаум, Р.Р. Мак-Иннес, Х.Ф. Виллард; пер. с англ. А.Ш. Латыпова; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.

**6-ТАРАУ**

**ҚОРШАҒАН ОРТАНЫ ЛАСТАУШЫЛАРДЫҢ МУТАГЕНДІК ДЕҢГЕЙІН АНЫҚТАУҒА ЖӘНЕ БАҒАЛАУҒА АРНАЛҒАН ТЕСТ-ЖҮЙЕЛЕР МЕН ТЕСТ-ОБЪЕКТІЛЕР**

6.1 Генетикалық мониторинг үшін тест-жүйелерді таңдау критерийлері

Қоршаған ортаны мутагендік факторлармен ластау проблемасын тек табиғатта айналатын мутагендер, олардың әсер ету механизмдері және мүмкін генетикалық салдары туралы білсе ғана мүмкін болады. Сондықтан химиялық мутагендерді сынау мен бағалаудың әртүрлі аспектілерін зерттеу, қолданбалы тест жүйелерін талдау, пайдаланылатын сынақ объектілерінің әр түрін кеңейту қажеттілігін негіздеу қажет.

Қазіргі уақытта пайдаланылатын және әзірленген тест-жүйелері белгілі бір талаптарға жауап беруі керек, соның ішінде: мүмкіндігінше генетикалық зақымданудың көптеген түрлерін анықтау (хромосомалық аберрация, ген, геномдық мутация); тест-жүйесінің сезімталдығы мен репродукциясы; мутагендердің метаболикалық өзгерістерін есепке алу; әдіснамалық қол жетімділік және жүргізудің уақтылығы; ақпарат мазмұны және қол жетімділігі. Стихиялық мутагенездің төмен деңгейі бар генетикалық тест-жүйелері (лимфоциттер, траденсканций аталықтарының түктері), әдетте, өте ақпараттылыққа ие. Мұндай жүйелер төмен дозалар мен концентрациялардың биологиялық әсерін талдауда тиімді.

Биотестестіру кезінде белгілі сипатталған сынақтардың шектеулі жиынтығы қолданылады. Ондаған сынақ объектілерінің арасында микроорганизмдер қоршаған ортаны ластайтын заттардың мутагендігін есепке алу үшін қолданылады, өйткені олар кез-келген экожүйенің тұрақты құрамдас бөлігі болып табылады. Микроорганизмдер бойынша тесттер экономикалық тұрғыдан арзан және тез ақпарат береді. Ең жиі қолданылатын тестілеу жүйелерінің қатарына вирустық және бактериялық сынақ жүйелері, атап айтқанда, Амес сынағы жатады. Қазіргі уақытта Амес әдісімен мутагенді анықтау әдісі бойынша эксперименттік материалдар жинақталған және қоршаған ортадағы «жүзетін» көптеген химиялық заттардың ішінде тек 5% -ы ғана гендік мутацияны тудыруы мүмкін екендігі, олардың 90% -ы жануарларға арналған канцерогендер екендігі көрсетілген.

Жануарлар сынақ объектісі ретінде қолданылатын көптеген жүйелер бар. Химиялық қосылыстардың *in vivo*-дағы мутагендік белсенділігін зерттеу үшін қолданылатын сүтқоректілердің сүйек майы.

Қоршаған ортаны ластайтын заттардың мутагендігін анықтау үшін тест жүйесі ретінде қан лейкоциттері қолданылады. Микро ядролық сынақ сонымен қатар мутагендердің әрекетін анықтауға жеткілікті тиімді көрсеткіш болып табылады. Алғашқы зерттеулерде мутагендерге ұшыраған адамдардың сүйек кемігі жасушалары мен лимфоциттері қолданылды. Микронуклеялар сонымен қатар адамның перифериялық қанындағы эритроциттерде зерттеледі. Алайда, бұл өте ауыр процедуралар.

Өсімдіктерді сынау жүйесін қолданудың өзектілігі мәдени және жабайы өсімдіктер негізінен химиялық ластаушы заттарға ұшырайтындығына байланысты. Өсімдіктерде ген мутацияларының жиілігінің жоғарылауы және радиациялық дозаға байланысты хромосомалық аберрациялар анықталды, көптеген химиялық қосылыстардың мутагендік белсенділігі алғаш рет көрсетілді. Сонымен қатар, кейбір химиялық қосылыстар, мысалы триазин гербицидтері, тікелей сынау кезінде және жануарлардың активтенуі жағдайында микроорганизмдер үшін мутаген емес, өсімдік тіндеріндегі мутагендерге айнала алатындығы белгілі. Мұндай қосылыстар өсімдіктердің мутагендері ретінде белгілі. Әрине, олар тікелей мутагендерге қарағанда әлдеқайда үлкен қауіп тудырады, олар, әдетте, сүтқоректілердің микросомалары арқылы ажыратылады. Алайда ластаушы заттардың бұл тобы салыстырмалы түрде аз зерттелген.

Өсімдіктерді сынау жүйелерінде қолданылатын негізгі әдістер - бұл құрылымдық хромосома аномалияларын тіркеуге негізделген цитогенетикалық талдау әдісі, сондай-ақ тозаң микроспорогенезі мен құнарлылығын талдау.

Алайда, бірде-бір тесттік жүйе барлық мутагендік агенттерді анықтай алмайды. Осыған байланысты сынақ жүйелерінің аккумуляторларын жасау қажет. Көп компонентті тест жүйесі келесі талаптарды қанағаттандыруы керек:

-құрамында про- және эукариотты организмдер бар; тірі патшалықтардың өкілдері болуы;

-зертханалық жағдайда жақсы өсетін сынақ ағзаларын қамтиды; қоршаған ортаны ластайтын заттарға өте сезімтал организмдер кіреді;

-таралуы кең, биологиясы мен экологиясы жақсы зерттелген организмдерге артықшылық беру керек;

- тіркелуі күрделі және қымбат тұратын аппаратураны пайдалануды талап етпейтін, бірақ жеткілікті ақпарат көлемін көтеретін тест-организмдердің тест-реакцияларын қосу.

Дегенмен, метафазада (метафазалық әдіс) және анафазада (анафазалық әдіс) хромосомалардың құрылымдық бұзылуын тіркеуге негізделген цитогенетикалық тесттер қоршаған ортаның мутагендік факторларын анықтауға бағытталған қазіргі заманғы экологиялық зерттеулердегі өзінің өзектілігін жоғалтпаған.

Қоршаған ортаның әртүрлі факторларының мутагендігін бағалау сынақ жүйелерін қолдану арқылы жүргізілуі керек. Әлемнің көптеген елдерінде қарқынды жұмыс жүргізіліп жатқанына қарамастан, қолданыстағы сынақ жүйелерінің ешқайсысы адамдарға тест қосылыстарының мутагендік қасиеттерінің болуын немесе болмауын бағалауда 100% тиімді емес.

Қазіргі уақытта бірнеше жүздеген тест жүйелері белгілі болғанына қарамастан, әдетте, биотесттендіру кезінде сипатталған сынақтардың шектеулі жиынтығы қолданылады. Тест объектілерінің әрқайсысы әдетте қоршаған ортаның жай-күйін бақылаудың осы әдісінде қолдануға болатын өлшемдердің бірін қолданады. Бұл негізінен хромосомалық аберрациялар, апа-хроматидтік алмасулар, анеуплоидты жасушалардың жиілігін бағалау және микроэлементтерді сынау. Алайда, бұл критерийлер әрқашан қолданыла бермейді, сонымен қатар қымбатқа түседі. Осыған байланысты, оларға қосымша, кешенді бағалаудың жаңа критерийлерін қолдану және дамыту қажет. Бір сынақ объектісіне осы критерийлердің жиынтығын қолдану оның сезімталдығының шегін арттыруға көмектеседі, сонымен қатар қоршаған орта компоненттерін барабар бағалау үшін бірнеше тест жүйелері мен нысандарын таңдау проблемасын шешуі мүмкін.

6.2 Ортаны ластаушылардың мутагендігін аңықтау және бағалау үшін тест-объектілер ретіндегі микроорганизмдер

Қоршаған ортаны ластайтын заттардың мутагендігін есепке алуға арналған ондаған сынақ объектілерінің ішінде микроорганизмдер өте сезімтал және өте танымал болып табылады. Бұл кез-келген экожүйенің тұрақты құрамдас бөлігі болып табылатындығына байланысты. Сонымен қатар, микроорганизмдердің репродуктивті кезеңі өте қысқа, осыған байланысты генотиптердің өзгеруін қысқа мерзімде тіркеуге болады. Хромосомалардың гаплоидты жиынтығы және бактериялардың генотипінің бұзылуы бірден олардың фенотиптік көрінісін табуы маңызды. Микроорганизмдерде фенотиптің өзгеруін есепке алудың жеткілікті дамыған әдістері бар. Сонымен қатар, микроорганизмдер бойынша тесттер үнемді болып табылады, олар сізге тез ақпарат алуға және статистикалық шамалығы бойынша жеке тәжірибелер арасында өзгергіштік беруге мүмкіндік береді.

*Вирустық тест-жүйелері.* Вирустар белгілі бір дәрежеде белгілі бір жасушалық функциялардың белсенділігінің индикаторы ретінде және мүмкін заттардың мутагендігін анықтауға арналған тест жүйесі ретінде қарастырылуы мүмкін. Бұл ДНҚ мен РНҚ вирустарына да қатысты. Бір қызығы, адам және жануар вирустарында тексерілген мутагендер вирустардың екі тобына да белгілі мутагендік қасиетке ие.

*Бактериалды тест-жүйелері. Эймс сынағы*.Бұл әдіс химиялық заттардың немесе олардың метаболиттерінің *Salmonella tifimurium* индикаторлық штамдарында гендік мутацияны тудыратын қабілетін есепке алуға негізделген. Бұл ықтимал мутагендік ортаны анықтайтын ең көп таралған жылдам әдістердің бірі. Амес сынағы екі компоненттен тұрады: жазу және активация. Жазу бөлігі - *S. typhimurium* индикаторлық штамдарының жиынтығы. Белсендіретін компонентке егеуқұйрықтың гомогенантының постмитохондриялық супернатанты (S-9 фракциясы) және микросомалық тотығу жүйелерінің қалыпты жұмыс істеуі үшін қажет факторлар кіреді.

*SOS-хромотест.* Бұл тест мутация процесінің SOS-репарация функциясының салдары туралы қазіргі идеяларға негізделген. SOS-хромотест - бұл генотоксиндерге арналған сандық колориметриялық сынақ. Әдіс *Escherichia сoli* тестер штаммының бактериялық жасушаларында әртүрлі заттардың немесе олардың метаболиттерінің геноуыттылығын тексеруге мүмкіндік береді.

6.3 Ортаны ластаушылардың мутагендігін анықтау және бағалауға арналған өсімдік тест-жүйелері

Қоршаған ортаны бақылауда интегралдық мутагендік әсерлерді биоиндикациялау үшін табиғи тірі организмдердің, соның ішінде өсімдіктердің жеке түрлерінің модельдік объектілері мен популяциясы қолданылады. Өсімдіктер биотаның осал компоненті болып табылады, өйткені олар трофикалық тізбектің негізгі буыны болып табылады, әртүрлі ластаушы заттарды сіңіруде үлкен рөл атқарады және субстратқа байлануының арқасында бүкіл әлемде де, аймақта да таралған ластаушы заттарға үнемі ұшырайды. Жануарлар мен микроорганизмдерге жүргізілген сынақтармен салыстырғанда, өсімдіктерді сынау жүйелері мутагендік белсенділігі бар көптеген ластаушы заттарға сезімтал, олар олардың соматикалық және генеративті жасушаларында болады.

*Саңырауқұлақтар мутагендерді анықтауға арналған сынақ объектісі ретінде.* Саңырауқұлақтар фитопатогендер арасында басым орын алады. Бұл организмдердің өкілдері қоршаған ортаны ластайтын заттардың мүмкін генетикалық қауіптілігін бағалау үшін жиі сынақ объектілері ретінде қолданылады. *Saccharomyces cerevisiae* ген мутациясын, *Aspergillus nidulans* және *Neurospora crassa* анеуплоидияны көрсетеді.

*Микроспорогенез әдісі және тозаң құнарлығын талдау.* Өсімдіктерге мутагендердің әсер ету сипатын зерттеу үшін көптеген тозаң генетикалық сипаттамалары қолданылады: түрлері, формасы, ою-өрнегі, стерилділігі мен өміршеңдігі, ішкі сипатқа сәйкессіздік, ақуыз және крахмал мөлшері. Тозаңның мониторингтік зерттеулерге жарамдылығы оның фитотоксиканттарға жоғары сезімталдығымен анықталады. Оның гаплоидты күйі тозаңның пайда болуы кезінде болатын өлімге әкелетін мутацияны көрсетуге мүмкіндік береді. Өсімдіктер үшін мутагендердің аналық жасушалардың, тозаңдардың, тозаң түйіршіктерінің пайда болуының және олардың жұмысының барлық сатыларына прогрессивті теріс әсері көрсетілген (21-сурет).

*Мутагендік факторларды анықтаудың цитогенетикалық әдістері. Метафаза әдісі.* Өсімдік жасушаларының хромосомалары цитогенетикалық тәжірибелерде өте кең қолданылады. Өсімдік жасушаларынан препараттарды дайындаудың қарапайымдылығы, жануарлардың хромосомаларына қарағанда үлкен өлшемдер, үлгінің анықтылығы және басқа параметрлер өсімдік заттарын хромосомаларды зерттеуде таптырмайтын етеді.

1-фертильді шаңды дәндер, 2-стерильді шаңды дәндер.

21-сурет – Кәдімгі қарағайдың тозаңды дәндері (*Pinus silvestris L.*).

Хромосомалық атерацияны талдау үшін жасушаның қарқынды бөлінуі бар өсімдік тіндерінен дайындалған уақытша немесе тұрақты препараттар қолданылады (22-сурет).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Арпа метафаза тақтасы қалыпты жағдай (2n=14) | Дицентрлік  хромосомалар | Центрикалық сақина |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Изолокустық үзіліс | Жұптастырылған соңғы фрагмент | Нүктелік фрагмент |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Дара фрагменттер | Хроматидті делеция | Нүктелік фрагмент |
|  |  |  |

22-сурет- Арпа тұқымындағы стандартты мутаген метил метанесульфонатымен (ММС) туындаған хромосомалық және хроматидті түрлердің құрылымдық бұзылыстары, х1000

Метафаза әдісі митоз метафазасындағы хромосомалардың құрылымдық қайта құрылуын есептеуге және сипаттауға негізделген. Құрғақ тұқымдар әдетте мутагенмен өңделеді олардың ядролары жасуша циклінің бірдей сатысында болады (G0).

*Анафаза әдісі.* Хромосомаларды анафазалық талдау ең жылдам, ол аберрацияны анықтауға мүмкіндік береді (23-сурет).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| Анафаза нормада | Хромосомалардың полюстерге бөлінуіндегі бұзылулар | |
|  |  | |
|  |  |  |
| Хромосомалардың артта қалуы | Хромосомалар мен фрагменттердің артта қалуы | Хромосомды көпір және фрагменттер |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Нүктелік фрагменттер | Хромосомды көпір | Хромосомды көпір және фрагменттер |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Хромосомалардың айырылысындағы бұзылыс | Хромосомаларды қалуы | Көптеген фрагменттер |

23-сурет – Арпа дәндерінің тамырлық гермиалды меристемасы жасушаларында ММС тудырған митозды анафазадағы хромосомалық құрылымдық ауытқулар, х1000

Анафазаны талдау метафазадан гөрі аномалияны анықтай алатындығы анықталған бірқатар жұмыстар бар. Бұл агенттің сипатына (оны қайта құру қандай түрге әкеледі), сондай-ақ әртүрлі нысандардағы хромосомаларды біріктірудің тең емес қабілетіне байланысты. Анафаза әдісі әдетте көптеген хромосомалар жиынтығы бар өсімдіктер мен нашар зерттелген морфологияны зерттеуде қолданылады.

6.4 Сүтқоректілер тест-объектілер және жануарлар тест-жүйелер ретінде ортаны ластаушылардың мутагенділігін анықтау және бағалау үшін

Бірде-бір тест жүйесі барлық мутагендерді анықтай және сипаттай алмайтындықтан, ДДҰ сарапшылары бірнеше сынақтарды қолданған жөн, және оны ең алдымен сүтқоректілерде жасау керек деп шешті. Сонымен қатар, белгілі бір мәселелерді шешу үшін in vitro және submammalian сынақ жүйелерін қолдануға болады. Жануарлар объектілеріндегі қоршаған ортаны ластайтын заттардың мутагендік қабілетін бағалаудың келесі цитогенетикалық әдістері бар: микроэлементті сынау, хромосомалық атерацияның метафаза анализі, хроматидтік алмасу, мұраланған транслокацияны есепке алу, инверсияны анықтау әдісі, доминантты өлім мутациясына цитогенетикалық тест, ерте эмбриондарға цитогенетикалық талдау. жыныстық-өлімге әкелетін мутациялар, соматикалық мозайка әдісі, сперматозоидты анормальды тексеру және т.б.

*Адам қанындағы лейкоциттер - қоршаған орта мутагендерін бағалауға арналған тест-жүйесі*. Химиялық заттарды зерттеуде (әсіресе өнеркәсіптік кәсіпорындарда мутагендік белсенділік үшін адам лимфоциттерінің мәдениеті жиі қолданылады. Бұл тест жүйелерінде қолданылатын басқа заттармен салыстырғанда бірқатар артықшылықтарға ие. Сіз мыналарды көрсете аласыз:

1. Тікелей донорлардан да, қан құю пункттерінен де алынған материалдардың болуы;

2. Тәжірибеге енгізілген жасуша популяциясының массасы, сондықтан 1 мл қан құрамында1-3x106 ұсақ лимфоциттер болады;

3. Лейкоциттердің жасушалық популяциясының синхронизмі, өйткені шеткергі қан жасушаларындағы барлық ядролар тыныштықта;

4. Белок-полисахарид кешені бар заттардың әсерінен лейкоциттер популяциясының жасушалық циклі бойымен қозғалыс басталуын реттеу мүмкіндігі;

5. Ақ қан клеткаларын өсіру әдісі, оларды бекіту және дәрілерді дайындау әдістемесі;

6. Табиғи мутация процесінде хромосомалардың қайта құрылу түрлерін, олардың төмен деңгейін зерттеу;

7. Кейбір жағдайларда бірінші және соңғы жасушалық циклдегі лейкоциттердің жасушалық популяцияларының қозғалу мәселесінің дамуына сәйкес материалды бекіту уақыты туралы мәселені зерттеу;

8. Бірінші жасушалық циклдегі G1, S және G2 фазаларының транзиттік уақыты туралы білу.

*Цитогенетикалық тест-жүйелері.* Жануарлар жасушаларының хромосомалары цитогенетикалық тәжірибелерде өте кең қолданылады. *In vitro* цитогенетикалық сынақтар мәдениетті жасушалардағы хромосомалық аберрацияны (хромосомалардың құрылымдық қайта құрылуы) анықтау үшін қолданылады. Әдетте, бұл сынақтарда жасушалар митоздың метафаза сатысында талданады. Цитогенетикалық зерттеулерде үлкен ДНҚ зақымдалуы анықталады.*In vivo* цитогенетикалық сынақтарына метафаза хромосомасын талдау және микроэлектрлік тестілеу кіреді. Хромосоманың қайта құрылуы жасушаларда пролиферация жасушаларының метафаза сатысында талданады (мысалы, сүйек кемігі). Сүйек кемігінің жасушалары жоғары митоздық белсенділіктен басқа, спонтанды мутацияның тұрақты деңгейімен сипатталады (1-2%). Тестілеу кезінде хромосомалық және хроматидті типтердің аберрациясы, сондай-ақ агроматикалық кеңістіктер немесе олқылықтар ескеріледі.

Микро ядролық сынақ адамдағы мутагендердің әсер ету көрсеткіштері ретінде қолданылады. Алғашқы зерттеулерде мутагендерге ұшыраған адамдардың сүйек кемігі жасушалары мен лимфоциттері қолданылды. Микронуклейнді сонымен қатар адамның шеткергі қанының қызыл қан жасушаларында зерттеуге болады. Микронуклеус тесті қарапайым және тез талданады. Сондықтан ол көбінесе *in vivo* цитогенетикалық белсенділігі үшін химиялық қосылыстарды скринингте қолданылады. Микронуклейлер - бұл центромерлер жетіспейтін хромосомалардың бөліктері. Сондықтан мұндай хромосомалар жасуша бөліну кезінде жоғалады. Микронуклеялар анафазалық қалыпта қалған хромосомалардан да пайда болуы мүмкін. Микронуклеологиялық талдау нәтижелері зерттелген қосылыстың хромосомаларға кластогендік әсерін көрсетеді.

*ДНҚ-кометалары әдісі.* Соңғы жылдары ДНҚ-комета әдісі өте танымал болды, әртүрлі химиялық заттардың мутагендігін анықтау және бағалау үшін сәтті қолданылады. ДНҚ-құйрықты талдауды (DNA-comet assay, оқшауланған жасуша гелі электрофорез әдісі) алғашында Ostling О. және Johansson K.J. 1984 жылы сипатталған. Бұл *in vivo* және *in vitro* жүйелерде қолданылады және жалғыз жасушалар деңгейінде ДНҚ-ны зақымдау мен қалпына келтіруді зерттеудің тез және сезімтал әдісі. Бұл әдістің сілтілік және бейтарап өзгерістері бар. Сілтілік варианттың көмегімен негізінен бір тізбекті үзілістер мен сілтілі лабильді учаскелер жазылады, ал бейтарап опциямен, негізінен, екі қатарлы ДНҚ үзілістері жазылады. Қазіргі уақытта әдіс әртүрлі дәрілердің, тамақ өнімдерінің, экологиялық қауіпті факторлардың және химиялық қосылыстардың генотоксичностылығын анықтау үшін зерттеулерде кеңінен қолданылады. Бұл әдісті қоршаған ортада болатын генотоксиканттардың кішкентай дозаларына ұзақ уақыт әсер етуді зерттеуде тиімді қолдануға болады.

ДНҚ-комета әдісінің артықшылықтары, кемшіліктері мен мүмкіндіктері тышқандардың сегіз ішкі мүшелеріндегі 208 химиялық қосылыстардың генотоксикалық белсенділігін зерттеуде көрсетілді. Бұл зерттеу осы әдістің маңызды артықшылықтарының бірі - кез-келген органдағы ДНҚ-ның зақымдалуын оның митотикалық белсенділік дәрежесіне қарамастан анықтау мүмкіндігі екенін көрсетті. Сезімталдықта ДНҚ-комета әдісі дәстүрлі цитогенетикалық сынақтармен салыстырылады, ал кейбір жағдайларда олардан асып түседі.

*Миотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерінің құрылымындағы бұзушылықтарды есепке алу.* Аналық жасушалардағы заттардың мутагендік белсенділігін зерттеу сүтқоректілердің микроб жасушаларының даму процестері мен әр түрлі даму сатыларының ұзақтығын нақты білуді қажет етеді. Сперматогенез - бұл қатаң генетикалық және гормоналды бақылауда болатын, аналық ұрық жасушаларының дамуының күрделі динамикалық процесі, кеңістіктік-уақыттық заңдылықтарға бағынады және өздігінен жаңару және бағаналы сперматогониялық жасушаларды анықтау (анықтау), пролиферация және апоптоз, дифференциация және мейоз сияқты процестерді қамтиды. жөндеу және қалпына келтіру. Дифференциалды сперматогония митоздық жасуша бөлінуінің циклдерінен өтіп, А-сперматогония, аралық (In) және B-сперматогония ретінде белгіленеді.

Тышқандарда А сперматогониясының жеті түрі сипатталды:Asingle, Apair, Aaligned, А1, А2, А3 и А4 (23-сурет). Asingle сперматогониялық бағаналы жасушалар болып саналады, Apair и Aaligned сперматогония колонияларын құрайды. Aaligned типті сперматогония A1 түріне ауыстырылады. A1 сперматогониясының кейінгі бөлінуі және жасушалары жаңа жасушалық ұрпақтардың пайда болуына әкеледі: типтегі сперматогония А2 → А3 → А4 → In (аралық тип) → B. Asingle - бұл өзін-өзі жаңартуға қабілетті жалғыз сперматогония. Теориялық тұрғыдан, бір Asingle типтегі сперматогониядан 1024 сперматоцит түзіледі, бұл 4096 сперматозоидтың пайда болуына әкеледі.

Адамдарда А-сперматогонияның 2 түрі сипатталған - Adark и Apale. Adark типтегі сперматогония регенеративті резерв,ал Apale - алдыңғы жасушалар ретінде жұмыс істейді. Адам прогенит жасушаларынан сперматоциттер пайда болмас бұрын 2 митоздық бөлінуден өтеді (24-сурет). Теориялық тұрғыдан Apale типіндегі бір сперматогониядан 4 сперматоцит түзіледі, бұл 16 сперматозоидтың пайда болуына әкеледі.

Ұяшықтар астындағы жақшалардағы саны дифференциацияның құрамына кіретін кез-келген ұрпақты жасушадан алынған аналық жасушалардың жалпы санын білдіреді.

24-сурет - Сүтқоректілердің әртүрлі түрлеріндегі сперматогенездің премиотикалық сатыларының схемалық көрінісі ( J. Ehmcke бойынша, 2006)

Тінтуірде Аsingle типті бір сперматогония зақымдалса, 4096 генетикалық зақымдалған сперматозоидтардың пайда болуы немесе олардың іріктеуінің бұзылу қаупі бар, ал адамда 1 Apale прекурсорлық жасушаның бұзылуы 16 сперматозоидтың бұзылуымен жүреді.

25-суретте тәжірибелік кемірушілерде (тышқан, егеуқұйрық) және адамдардағы сперматогенездің әртүрлі кезеңдерінің ұзақтығының диаграммасы көрсетілген.человека.

ДНҚ репарациясы штриховкамен белгіленген кезеңдерде болмайды.

25-сурет - тышқандарда, егеуқұйрықтарда және адамдарда аналық ұрық жасушаларының даму ұзақтығы (I.-D. Adler бойынша, 1996)

Сперматогендік ұрық жасушалары әрдайым организмде болады. Сперматогонияны саралау кезеңі тышқанмен шамамен 6 күн, егеуқұйрықтарда 10,5 күн және еркектерде 16 күн ішінде болады. Сперматоциттердің жалпы даму процесі, соның ішінде мейоз, тышқанмен шамамен 14 күн, егеуқұйрықтарда 19 күн, еркектерде 25 күн.

Сперматидтерге бөліну тышқандарда шамамен 9 күн, егеуқұйрықтарда 12 күн және еркектерде 16 күнді алады. Ұрық сперма кезеңін қосқанда, тышқандардағы сперматогенездің жалпы ұзақтығы - 35 күн, егеуқұйрықтарда - 50 күн, адамдарда - 64 күн. Сондықтан, сперматогенез процестерін және химиялық заттардың осы процестерге экспериментальды жануарлардағы әсері туралы түсінік адамзат популяциясының еркек құрамы үшін әртүрлі ксенобиотиктерге ұшыраған кезде генетикалық қауіпті анықтауға мүмкіндік береді.

Мейоздың І-ші профилактикасындағы хромосомалық ауытқуларды анықтаудың ақпараттық әдістерінің бірі - синаптонемальды кешендердің (СК) жалпы дайындықтарын талдау. СК - бұл мейоздың I профазасында біріктірілген екі гомологты хромосоманың арасында түзілген үш қабатты таспа тәрізді ақуыз құрылымы(26-сурет).

I профилактикасы кезінде меиотикалық хромосоманың синапсы СК көмегімен жүреді. Хромосома синапсисінің бұзылуы гомологиялық рекомбинацияны нашарлатады, нәтижесінде хромосоманың бөлінуі бұзылады (анеоплоидты гаметалардың пайда болуы) немесе сперматогендік жасушалардың іріктелуі. Сондықтан, СК құрастыруы сәтті мейоз және сау ұрық жасушаларын шығару үшін қажет.

А

Б

26-сурет - Сүтқоректілердің синаптонемальды кешенінің (A) және иммуностаинингтің (Б) схемалық көрінісі (J. Fraune бойынша, 2016)

Жалпы СК препараттарын талдау бізге бірінші ретті сперматоциттердегі хромосома синапстарының бұзылуының сипатын анықтауға, хромосомалық атерациялардың болуы мен түрлерін анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдістің тиімділігі колхициннің мутагендік белсенділігіне, тұмауға қарсы препараттарға және радиациялық әсерге тестілеу арқылы көрсетілді. СК-ны меиотикалық хромосомалардың, мейоз аномалияларының және адамдардағы бедеуліктің себептерінің өздігінен және туындаған бұзушылықтарының маркері ретінде, сондай-ақ ксенобиотиктердің әсерінен генетикалық қауіпті болжау үшін қолдануға болады.

6.5 Ортаны ластағыштарды анықтауға және бағалауға арналған көп компонентті тест-жүйелер

Жоғарыда айтылғандай, бірде-бір жүйе барлық мутагендік агенттерді анықтай алмайды. Осыған байланысты сынақ жүйелерінің аккумуляторларын жасау қажет. Көп компонентті тест жүйесі келесі талаптарды қанағаттандыруы керек:

-про- және эукариотты организмдерден тұрады;

-өз құрамына тірі патшалықтардың өкілдері болуы;

-зертханалық жағдайда жақсы өсетін сынақ ағзаларын қосады;

-қоршаған ортаны ластайтын заттарға өте сезімтал организмдерді қосады;

-артықшылығы кең таралған аймаққа, биология мен экологияны жақсы зерттеген организмдерге берілуі керек;

-тіркеуі күрделі және қымбат жабдықты пайдалануды қажет етпейтін, бірақ сонымен бірге жеткілікті мөлшерде ақпарат алатын тестілеу ағзаларының осындай реакциялық реакцияларын қосыңыз.

Ксенобиотиктердің көпшілігі тірі организмдердің популяцияларында генетикалық жүктеменің жоғарылауына әкелетін белгілі бір жағдайларда тұқым қуалайтын материалға шабуыл жасай алатын потенциалды мутагендер. Бұл тенденция қазірдің өзінде байқалады және көптеген түрлер популяциясының санының күрт азаюына әкеледі және қысқа мерзімде жеке популяциялардың ғана емес, сонымен бірге бүкіл түрлердің де толық жойылуына әкелуі мүмкін. Антропогендік сипаттағы әртүрлі экологиялық қауіпті ОС факторларының теріс әсерін жан-жақты зерттеу, бірақ ел экономикасы үшін, тіршілік деңгейінің әртүрлі деңгейлерінде маңызды болып табылады. Осы зерттеулердің нәтижелері сөзсіз ықтималдылықтың белгілі бір дәрежесін болжауға мүмкіндік береді, атап айтқанда генетикалық және денені экотоксиканттардың теріс әсерінен қорғаудың алдын-алу шараларын жасауға негіз болады.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / [С.А. Гераськин, Е.И. Сарапульцева, Л.В., Цаценко и др.]; под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М. Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.

2 Абилев С.К. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие / С.К. Абилев, В.М. Глазер. – М.; СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.

3 Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. – М.: РАМН, РСНХН, 2006

4 Adler I.-D. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans / I.-D. Adler // Mutat. Res. - 1996. - Vol. 352, № 1-2. - P. 169-172.

5 Богданов Ю.Ф. Синаптонемный комплекс - индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом / Ю.Ф. Богданов, О.Л. Коломиец. - М.: КМК. – 2007. – 360 с.

6 Fraune J. Evolutionary history of the mammalian synaptonemal complex / J. Fraune, C. Brochier-Armanet, M. Alsheimer, J.-N. Volff, K. Schücker, R. Benavente // Chromosoma. - 2016. – V. 125, № 3. – Р.355-360.

7 Allen J.W. Synaptonemal Complex Analysis of Mutagen Effects on Meiotic Chromosome Structure and Behavior / J.W. Allen, P. Poorman-Allen, L. Backer, B. Westbrook-Collins, M. Moses // Proceeding of Conference «Biology Of Mammalian Germ Cell Mutagenesis». - New York: Cold Spring Harbor, 1990. – Р. 155-170.

8 Mortelmans K. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay / K. Mortelmans, E. Zeiger // Mutation Research – 2000. – Vol. 455 – P.29–60.

9 Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // Онкология. – 2008. – Т. 10. – № 3. – С.303–309.

10 Ehmcke J. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives / J. Ehmcke, J. Wistuba, S. Schlatt // Hum Reprod Update. – 2006. – Vol.3, № 12. – Р. 275-282.

**7-ТАРАУ**

**АДАМНЫҢ ЦИТОЕНЕТИКАСЫНЫҢ НЕГІЗДЕРІ.АДАМ ХРОМОСОМАЛАРЫНЫҢ ЖІКТЕЛУІ МЕН НОМЕНКЛАТУРАСЫ**

*Адамның хромосомалары қалыпты жағдай.* 1956 жылыTjio мен Levan адамның диплоидтық жиынтығында 46 хромосома болатындығын анықтады. Адамның метафазалық хромосомаларының мөлшері 10 мкм-ден 2 мкм-ге дейін. Қазіргі уақытта адамның кариотипі адам хромосомаларының саны, мөлшері және құрылымы туралы мәліметтер жиынтығы ретінде өте дәл анықталған. Сонымен қатар, ол 99,99% адам геномы арқылы шифрланған.

Центромера жағдайына сәйкес адам хромосомалары метацентрлік (тең қол, хромосоманың ортасында орналасқан центромера), субметацентрлік (тең емес қол) және акроцентристік (хромосоманың аяғындағы центромера) болып бөлінеді. Диплоид жиынтығының 46 хромосомасы 23 жұп гомологтық (әкелік және аналық) хромосомалардан тұрады: 22 жұп аутосомалар мен XX жыныстық хромосомалар (әйелдерде) немесе XY (ерлерде).

Адам хромосомаларын белгілеудің бірыңғай жүйесін құру жөніндегі маңызды жұмысты 1960 жылы Денверде, Колорадо университетінде (АҚШ) Американдық қатерлі ісік қоғамының қолдауымен өткен арнайы комиссия жасады. Комиссия құрамына 1960 жылы адамның кариотипі туралы мәліметтерді жариялаған 14 цитолог кірді. 1963 жылы Лондонда адамның қалыпты кариотипі бойынша мәліметтерді стандарттау бойынша екінші конференция өтті. Денвер конференциясында дамыған адам хромосомаларының номенклатурасы уақыт сынынан өтті деп айтылды. 1966 жылы өткен Чикаго конференциясы адам хромосомаларының қалыпты және өзгертілген жиынтықтарын белгілеу жүйесін жасады. 22 адамның автозомалары 7 топқа бөлінеді, олардың арасындағы айырмашылық оңай анықталады (27-сурет).

*Адам хромосомаларының жіктелуі және номенклатурасы:*

А тобы (1-3) - бұл хромосомалардағы медианалық (хромосоманың ортасында орналасқан) және хромосомадағы 2 субмедиялық 2-хромосомада орналасқан орта хромосомалар. Бұл хромосомалар центромера жағдайы мен көлемінде оңай ерекшеленеді.

В тобы (4-5) - субмедиялық центромералары бар ірі хромосомалар, мөлшері де, морфологиялық жағынан да айырмашылығы жоқ.

С тобы (6-X-12) - орта деңгейлі хромосомалар субмедиялық центромерлер. Х хромосома осы топтың 6 және 7-ші жылдардағы ең ұзын хромосомаларына ұқсас, оларды ажырату қиын. Хромосомалардың төртеуі салыстырмалы түрде метацентрлік, оларды 6, 7, 8 және 11 деп санау ұсынылады, X хромосома осы топқа жатады. Үш хромосома біршама субметацентрлік, оларды 9, 10 және 12 деп санау керек. Бұл үлкен хромосомалар тобы жеке хромосомаларды анықтауда үлкен қиындықтар тудырады. 6-хромосома қысқа қолдың ортасында қайталама жиырылуға ие, ал 8 және 9 хромосомаларында центромераның жанындағы ұзын қолдың екінші жиырылуы болады.

E

F

G

D

С

А

В

Рис. 27 – Денвер конференциясында адамның кариотипін жіктеу (46, ХУ) (1960) ( А.Ф. Захарову бойынша , 1982)

D тобы (13-15) - орташа центромералары бар орташа мөлшерлі хромосомалар (акроцентрлік хромосомалар). Барлық үш жұп - спутник. Өздерінің арасында үш жұп хромосомалар морфологиялық тұрғыдан ажыратылмайды.

Е тобы (16-18) - орташа медианалық (хромосома 16), субмедиялық (хромосома 17) және субтерминалды (хромосома 18) центромералары бар өте қысқа хромосомалар.

F тобы (19-2-) - орташа медиоментрі бар қысқа хромосомалар, ажыратылмайды.

G тобы (21-22) - спутниктері бар өте қысқа акроцентрлік хромосомалар. Бұл жұптар бір-бірінен ажыратылмайды.

Y хромосома - өлшемі мен морфологиясы бойынша 21 және 22 хромосомаларына ұқсас, серіктері жоқ кішкентай акроцентрлік хромосома және ұзын білектің жақын хроматидтерімен сипатталады.

*Жыныстық хромосомалар.* Адамдардағы жыныстың анықтамасы мен қалыпты дамуы жыныстық хромосомалар жүйесімен байланысты: әйелдердегі ХХ және Х хромосомаларының мөлшері мен пішіні жағынан ер адамдарда бірдей. Адамдарда еркек жынысы гетерогаметикалық: шәуеттің жартысында X хромосома, жартысына Y хромосома бар. Әйелдердің барлық жұмыртқаларында (гомогаметикалық жыныс) тек бір Х хромосома болады.

*Хромосомалардың құрылымындағы өзгерістер.*Хромосомалық аберрациялар жиілігін білу физикалық, химиялық және биологиялық сипаттағы мутагендердің мутагендік әсерін бағалау кезінде әдетте қажет. Әртүрлі авторлардың жалпылама мәліметтері бойынша, басқарудағы хромосома бұзылған жасушалардың жиілігі 0-2% -дан аспайды. Әдетте, бұл хроматидтік үзілістер, хромосомалық үзілістер өте сирек кездеседі. Іс жүзінде ешқашан, сирек жағдайларды қоспағанда, центрлік немесе сақина тәрізді түзетулер болмайды.

Кейбір жиі қолданылатын қысқартулар және анормальды кариотиптердің мысалдары 1-кестеде көрсетілген.

1-кесте

Хромосомаларды сипаттауда қолданылатын кейбір қысқартулар және олардың ауытқулары (Р.Л. Ньюссбаум бойынша, 2010)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Қысқартулар | Мәні | Мысалы | Қалпы |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
|  |  | 46,ХХ | Қалыпты әйел кариотипі |
|  |  | 46,XY | Қалыпты ер адам кариотипі |
| cen | центромера |  |  |
| p | қысқа иық хромосома |  |  |
| q | ұзын иық хромосома |  |  |
| del | делеция | 46,XX,del(5p) | бір хромосоманың қысқа иық бөлігінің делециясы салдарынан "мысық крикасы" синдромы бар әйел 5 |
| der | хромосома туындылары (дериват) | der(1) | 1-хромосомадан алынған және оның центромерінен тұратын аударылған хромосома |
| dic | дицентрикалық хромосома | dic(X;Y) | X және Y хромосомаларының центромерлері бар транслокациялық хромосома |
| dup | дупликация |  |  |
| fra | сынғыш аймақ | 46,Y,fra(X)(q27.3) | сынғыш Х-хромосомасы бар ер |
| i | изохромосома | 46,X,i(X)(q10) | X хромосомасының ұзын қолының изохромосомасы бар әйел |
| ins | инсерция |  |  |
| inv | инверсия | inv(3)(p25q21) | 3хромосоманың перцентрлік инверсиясы |
| mar | маркерлі хромосома | 47,XX,+mar | қосымша белгісіз хромосома бар әйел |
| *1-кестенің жалғасы* | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| mat | аналық шығу тегі | 47,XY,+der(1)mat | анасынан мұраға қалған қосымша хромосома дер (1) бар еркек |
| pat | әкелік шығу тегі |  |  |
| r | сақиналы хромосома | 46,X,r(X) | сақина хромосомасы бар әйел Х |
| rcp | Реципрокты транслокация |  |  |
| rob | Робертсоновскті транслокация | rob(13;21)(q10;q10) | жыртылу және қайта қосылу 13 және 21 хромосомалардың орталық-центрлік 13 q10 21q10 диапазондар аудандарында болды. |
| t | транслокация | 46,XX,t(2;8)(q22;p21) | Хромосома 2 мен 8 хромосомасы арасындағы теңгерімді транслокациямен, 2 q22 және 8p21 аралығындағы әйел |
| ter | Терминальді аймақ немесе теломера | 46,X,del(X)(pter→q21:) | Xq21 -ден асатын Х хромосомасының ішінара дистальды жойылуы бар әйел(номенклатура хромосоманың қазіргі бөлігін көрсетеді) |
| + | артық | 47,XX,+21 | трисомия 21бар әйел |
| – | жетіспеушілік | 45,XX,–22 | моносомия 22 бар әйел |
| : | үзіліс нүктесі | 5qter→5p15: | алшақтығы 5p15 болатын хромосома 5-тың делециясы |
| :: | алшақтық және буын | 2pter→2q22::8p21→8pter | der(2)t(2;8) бөлік сипаттамасы |
| / | мозаицизм | 46,XX/47,XX,+8 | екі жасуша популяциясы бар, біреуі қалыпты кариотипі бар, екіншісі трисомия 8 бар әйел |
| ish | гибридизация *in situ* | ish 22q11.2(D22S75x2) | FISH Ди-Джорджи хромосома синдромы аймағының зондымен метафазды 22 хромосомаларда D22S75 локусы үшін 22q11.2, будандастырудың қалыпты үлгісін көрсетеді (екі сигнал = х2) |

*Кариотиптің жасқа байланысты өзгергіштігі.* Көптеген фактілер, атап айтқанда, тризомиямен ауыратын науқастарда құнарлылықтың жоғарылауына әкелетін ананың жасына байланысты хромосомалық бейімділіктің жиілігінің артуы, бір жағынан, қартаю кезінде соматикалық жасушалардағы мутацияға үлкен мән беретін концепцияның пайда болуына әкелді, екінші жағынан, қартаюға байланысты. жасушаларда мутацияның жинақталуы. Бұл бірқатар авторларды жас және кариотиптегі ауытқулар жиілігі арасындағы байланысты зерттеуге итермеледі. Бірқатар авторлар (Керкис, Раджабли, Браун, 1966) жас өскен сайын анеуплоидия жиілігі, әсіресе 60 жастан кейін жоғарылайтындығын көрсетті. Алайда, бұл нәтижелер әрдайым расталмайды.

*Адамдардағы мутагендік факторлар туралы жалпы түсінік.* Адамдардағы бірқатар аурулар эволюциялық дамыған хромосома жиынтығындағы сандық немесе құрылымдық өзгерістерге байланысты. Бұл бұзылуларды туғызатын ықтимал мутагендік факторлар үш негізгі болып табылады: физикалық, химиялық және биологиялық. Бұл факторлардың адам хромосомаларына әсері *in vivo*-да перифериялық қандағы лейкоциттер мен пациенттердің сүйек кемігінің жасушалары культурасында және *in vitro* жасуша дақылдарының әр түрлі эксперименттік зерттеулерінде зерттелді. Мутагендік факторлардың әсерінен, табиғатына қарамастан, көптеген сүтқоректілер мен өсімдіктердегі сияқты адам хромосомаларында да бірдей құрылымдық бұзылулар болатындығы анықталды. Адамның хромосомалары иондаушы сәулелерге өте сезімтал. Ата-аналардың әсерінен олардың ұрпақтарындағы даму кемістіктері арасында белгілі бір байланыс бар екендігі дәлелденді. Адамның соматикалық жасушаларына иондаушы сәулеленудің әсері сапалы және сандық жағынан бағаланатын хромосомалардың алшақтықтары мен қайта орналасуымен бірге жүреді. Сонымен қатар, бұл бұзылыстар бірқатар жасушалық ұрпақтарда берілуі мүмкін. Барлық типтегі хромосомалық түзулерді тудыратын көптеген дәрілер мутагендік қасиетке ие. Мысалы, ДНҚ синтезінің ингибиторлары, кейбір антибиотиктердің, цитостатикалық және басқа да бірқатар химиотерапиялық препараттардың құрамына кіретін алкилдеуші заттар. Көптеген вирустардың әсері сонымен қатар көптеген хромосомалардың және аневлоидтық үзілістердің (қызамық, тауықтың жұқпасы, инфекциялық гепатит, сары безгегі, асептикалық менингит және басқалары) пациенттердің шеткергі қан мәдениетінде пайда болуына әкеледі. Белгілі бір вирустардың әсерінен хромосомалардың зақымдануы өте ерекше және негізінен гетерохроматин аймақтарында (центромеральды және теломеральды аймақтар, қайталама таралу аймақтары) хромосома үзілістерімен бірге жүреді. Адамның хромосомаларына бірқатар вирустардың әсері ДНҚ синтезін тежегіштер сияқты химиялық агенттердің әсеріне ұқсас.

Эндогендік метаболизмнің бұзылуы сонымен қатар адамның хромосома аппаратындағы бұзылуларды тудыратын фактор болуы мүмкін (В12-жетіспеушілік анемия, аутоиммунды процестерге байланысты аурулар, нуклеин қышқылдарының метаболикалық бұзылыстары және т.б.). Дегенмен, эволюция процесінде адамның хромосомалық аппараты эндогендік метаболизмнің ауытқуларына және теріс эндогендік агенттердің пайда болуына жоғары қарсылыққа ие болуы әбден мүмкін. Толық шешілмеген мәселелердің бірі - соматикалық жасушалардағы мутагендік факторлардың цитогенетикалық әсері туралы деректерді экстраполяциялау мүмкіндігі. Мутагендік факторлардың әсерін экспериментальды зерттеу көбінесе адамдардан алыс объектілерде жүргізіледі. Сонымен қатар, сынақ объектісінің таксономиялық жағдайына байланысты әсерге сезімталдықтың қазіргі ерекшелігі көп жағдайда ескерілмейді. Адамдардың генетикалық және цитогенетикалық талдауындағы қиындықтар тек перифериялық қандағы лимфоциттер немесе сүйек кемігінің жасушалары зерттелетіндігінен туындайды, ал әртүрлі тіндердің мутагендік әсерге әр түрлі сезімталдығы бар екендігі белгілі. Әдетте, бізде қандай факторлардың хромосомаларға нұқсан келтіретіні туралы белгілі бір ойлар бар, бірақ біз әрқашан хромосоманың бұзылуынан, жасушалардың қайта құрылуынан және қалпына келтіру процестерінен кейін қандай оқиғалар болатынын нақты болжай алмаймыз. Шамасы, бұл оқиғаларды жасуша мен бүкіл организм деңгейінде әрекет ететін факторлар басқарады.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Ньюссбаум Р.Л. Медицинская генетика: учеб.пособие / Р.Л. Ньюссбаум, Р.Р. Мак-Иннес, Х.Ф. Виллард; пер. с англ. А.Ш. Латыпова; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.

2 Основы цитогенетики человека / под ред. Прокофьевой-Бельковской А.А.. – М.: Медицина, 1969. – 544 с.

3 Захаров А.Ф. Хромосомы человека: Атлас АМН СССР / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина, 1982. – 264 с.

**8-ТАРАУ**

**АДАМ ХРОМОСОМАЛАРДЫ ПРЕПАРАТТАРЫН АЛУДЫҢ ӘДІСТЕМЕЛІК НЕГІЗДЕРІ**

**8.1 Біркелкі боялған адам хромосомалардың морфологиясы**

Адамның хромосомаларын зерттеу үшін жоғары митоздық белсенділігі бар жасушалардың популяцияларын белсенді түрде бөлу қажет. Қазіргі уақытта мұндай жасуша популяциясын алу үшін тікелей және жанама әдістер қолданылады. Тікелей әдіс белсенді in vivo-дағы жасушалармен жұмыс жасауды қамтиды (мысалы, сүйек майы). Бұл әдіс негізінен жаңадан пайда болған гемопоэз жүйесінің цитогенетикалық зерттеулерінде қолданылады. Жанама әдістер дененің әртүрлі жасушаларын in vitro өсіруге негізделген. Мұндай мәдени клеткалардың көзі көбінесе перифериялық қан болып табылады. Фитогемагглютинин (митоз қоздырғышы) культуралық ортаға қосылады, ол лимфоциттердің белсенді бөлінуін тудырады, бұл домна трансформациясына ұшырайды. Сонымен қатар, тері белсенді бөлінетін жасушаларды алу үшін мәдениетте қолданылады. Терінің беткі қабатының кішкене бөлігі алынып, культуралық ортаға орналастырылады, ал тері астындағы дәнекер тінінің фибробласттары белсенді көбейеді. Кесілген эмбриондардың, сондай-ақ амниотикалық сұйықтық жасушаларының кеңінен қолданылатын тіндері. Адамның қан жасушаларын өсіру үшін жасалған көптеген әдістерді үш негізгі әдіске бөлуге болады: макрометод, жартылай микрометод және микрометод.

Хромосомалардың препараттарын көбейетін жасушалардан дайындау үшін колхицин немесе колцемид бар жасушаларға әсер ету қажет. Бұл агенттер 0,05-0,5 мкг / мл концентрациясында метафаза сатысында бөліну шыбықының жұмысына кедергі келтіреді және митозды тоқтатады, бұл метафаза плиталарының жиналуына ықпал етеді. Сонымен қатар, бұл химиялық агенттер сонымен қатар митоздық шыбықтың бөлінуіне, сондай-ақ хромосомалардың қысқаруына байланысты цитологиялық препараттар өндірісінде хромосомалардың шыны слайдқа жақсы таралуына ықпал етеді. Лимфоциттік культуралар үшін колхицин әсерінің оңтайлы ұзақтығы 1,5-2 сағатты құрайды, ал фибробластты культуралар үшін ол 5-6 сағатты құрайды.Колхицинге әсер ету уақытының ұлғаюымен метафазалардың жинақталуы жоғарылайды, алайда хромосомалар шамадан тыс конденсацияланады, бұл оларды талдауға аз мүмкіндік береді.

Хромосомалардың жақсы таралуы үшін жасушаларды гипотониялық ерітіндімен емдеу керек. Ол үшін әртүрлі құрамдағы және концентрациядағы тұздардың ерітіндісін қолданыңыз. Культураларды гипотоникалық ерітіндімен емдеу бөлме температурасында немесе +370С температурада термостатта жүргізілуі керек. Әдетте, концентрациядағы калий хлоридінің ерітіндісі 0,55% (0,07М) немесе 0,95-1,0% концентрациядағы натрий цитратының ерітіндісі қолданылады. Калий хлориді ерітіндісінде лимфоциттер 5-10 минут, ал натрий цитратының ерітіндісінде 15-30 минут инкубацияланады.

Келесі қадам - материалды бекіту. Бекітуші - мұздық сірке қышқылы мен спирт (метил немесе этил) 3: 1 қатынасында. Бекіту процедурасы ілмектің бірнеше өзгеруін қамтиды. Содан кейін бекітілген ұяшықтардың суспензиясы салқындатылған шыны слайдқа қазылады. Шыныдағы хромосомалардың жақсы дисперсиясын алу, олардың қабатталуын болдырмау маңызды. Содан кейін препараттар ауада кептіріледі.

Хромосомаларды бояу үшін келесі негізгі бояғыштар қолданылады: азур, орцеин, фуксин, фуксульфур қышқылы үшін негізгі және т.б. Боялмаған цитологиялық препараттарды ұзақ уақыт сақтауға болады. Көп жағдайда зерттеушілер Романовский-Джимса бояуын (ағын сумен сұйылту) немесе азур-эозинді қолданады. Бұл қарқынды хромосоманы бояуға мүмкіндік беретін ядролық бояғыштар. Олар карболалық фуксинді жиі қолданады. Фөлген реакциясында хромосомалар боялған, әдетте, бозарған; осы сәтте, сонымен қатар процедураның күрделілігі хромосоманың көптеген зерттеулерінде бұл түстердің аз қолданылуына мүмкіндік береді. Алайда, ДНҚ-ны сандық талдау кезінде бұл түс сенімді деп саналады. Орсеин бояуының басты кемшілігі - бояудың аз қарқындылығы.

Хромосомалық анализді әртүрлі мақсаттарда жүргізуге болады. Мысалы, медициналық цитогенетикада ауытқуларды анықтаған кезде және кариотипте осы ауытқулардың табиғатын анықтаған кезде талдау үшін метафаза тақталарын дұрыс таңдау маңызды. Біріншіден, метафаза тромбоциттерінің тұтастығы; екіншіден, хромосома қабаттасуының болмауы немесе аз болуы; үшіншіден, хромосомалардың конденсациясының орташа дәрежесі және, төртіншіден, метафаза пластиналарының бір-бірінен оқшаулануы. Егер осы жағдайлардың барлығы орындалса, хромосома талдауының негізгі міндеті - хромосоманы идентификациялау мүмкін болады. Қазіргі уақытта метафаза жасушаларын талдау және хромосомаларды анықтау үшін микрофотографтармен бірге кариотипті кескінді автоматты түрде алуға мүмкіндік беретін компьютерлік бағдарламалар қолданылады.

**8.2 Біркелкі боялған адам хромосомалардының морфологиясы**

Жоғарыда айтылғандай, осы түрге тән хромосома жиынтығының морфологиялық белгілерінің жиынтығы «кариотип» терминімен белгіленеді. Бұл тұжырымдама хромосомалардың жалпы санын, олардың өлшемдері мен формаларын қамтиды. Адамдардағы хромосомалардың диплоидтық саны 46. Хромосомалардың мөлшері абсолютті ұзындықта (микрондарда) немесе салыстырмалы ұзындықта көрінеді. Салыстырмалы ұзындық бір хромосома ұзындығының әйелдің гаплоид жиынтығының барлық хромосомаларының жалпы ұзындығына қатынасы арқылы анықталады. Адамның хромосомалары әртүрлі мөлшерде болады. Сонымен қатар, ең үлкен өлшемдер кішкентайынан 4-5 есе үлкен болуы мүмкін. Монохромды хромосомалардың пішіні центромера аймағында орналасқан бастапқы тарылу жағдайына байланысты анықталады. Хромосоманың нысаны қысқа иық ұзындығының барлық хромосоманың ұзындығына қатынасы ретінде сандық түрде сипатталуы мүмкін, 100% көбейтілген, бұл центромер индексі ретінде белгіленеді. Егер центромерикалық көрсеткіш 50% -ға жақындаса, онда мұндай хромосомалар метацентрлік деп аталады. Бұл индекстің мәні 50% -дан аз болған кезде хромосомалар субметацентрлік болып жіктеледі. Центромера дерлік соңғы күйге ауысқан кезде, мұндай хромосомалар акроцентрик деп аталады. Адамның кариотипі барлық үш типтегі хромосомаларды ұсынады.

Жоғарыда айтылғандай, адам хромосомаларының классификациясы мен номенклатурасы Денверде (1960), Лондонда (1963) және Чикагода (1966) өткен халықаралық жиналыстарда жасалды. Осы кездесулердің ұсыныстарына сәйкес хромосомалар жиынтықта олардың ұзындығына қарай қысқарған сайын орналастырылады. Көлемі жағынан ұқсас хромосомалар тобында одан әрі бөлу центромериялық көрсеткішті төмендету түрінде болады. Осы ретпен құрылған автосомалар (жыныстық емес хромосомалар) араб цифрларымен 1-ден 22-ге дейін нөмірленеді. Адамның жыныстық хромосомалары кариотиптеу кезінде орналасудың соңында орналастырылған X және Y латын алфавитінің әріптерімен белгіленеді. Барлық автозомалар құрылтай мүшелерінің ұзындығы мен пішінінде ерекшеленетін жеті топқа бөлінеді (A, B, C, D, E, F, G). Мұндай топтық идентификация ешқандай қиындық тудырмайды. А тобы (1-3) ең үлкен хромосомалардың үш жұбын қамтиды. Бұл топқа 2 метацентрлік хромосома және 40% центромера индексі бар 1 хромосома кіреді. В (4-5) тобына екі жұп ұзын субметацентрлік хромосомалар кіреді. С тобына 7 жұп субметацентрлік автосомалар кіреді, оларда центромериялық көрсеткіш шамамен 40-30% құрайды, ал Х хромосома олардан ерекшеленбейді. D тобы (13-15) 3 жұп акроцентрлік хромосомалардан, ал Е тобы (16-18) 3 жұп субметасентрлік хромосомалардан тұрады. F тобына (19–20) кіші метацентрлік хромосомалардың екі жұбы, ал G тобына (21–22) ең кіші акроцентрлік хромосомалар жатады. Y хромосомасы қандай-да бір топқа жатпайды, бірақ тәуелсіз ретінде оқшауланған.

Кариотиптеу кезінде Денвер кездесуінің барлық топтарында жекелеген хромосомалардың жұптарын оқшаулау ұсынылды. Алайда әрқайсысының сызықтық параметрлерін өлшеу нәтижелерімен күшейтілген жеке хромосомаларды анықтаудағы кейінгі тәжірибе өлшемі мен формасына сәйкес тек бес хромосоманы сенімді түрде анықтауға болатындығын көрсетті: төрт жұп автосомалар (1, 2, 3, 16) және Y хромосомасы. Метафазалардың көпшілігінде, түсінің жақсы болуымен 17 және 18 автозомаларды бір-бірінен ажыратуға болады.Сыртқы мөлшері мен формасындағы хромосомалардың жекелеген жұптарын сенімді түрде ажыратудың шектеулі мүмкіндіктері кез-келген жұптың гомологтары арасында конденсация деңгейінде де, жалпы да хромосомалар үшін айтарлықтай өзгергіштікке байланысты. иықтар.

Сәйкестендіру мақсаттары қосымша морфологиялық белгілер болып табылады, олардың арасында, ең алдымен, қайталама шектеулер бар. Ұйымдастырушылармен байланысқан және спутниктер құратын ядроларды қоспағанда, адам хромосомаларындағы бұл шектеулер құрылымдық гетерохроматиннің аймақтарының толық конденсациялануынан пайда болады. 1, 9 және 16 автозомалардың ұзын қолтықтарының орталық центрлік аймақтарында жүйелі түрде тарылу байқалады; 9 автосомадағы қысылу осы хромосомалардың біреуін немесе екеуін де С тобында таңдауға мүмкіндік береді. Басқа хромосомалардағы жиырылулар үнемі байқалады. Y хромосомасы акроцентрлі болып, G тобының акроцентрлік автозомаларынан ерекшеленеді, бұл апалы-хроматидтер бір-біріне сәйкес келеді, бұлыңғыр бастапқы тарылу, ұзын қолында екінші ретті тарылу жағдайларының болуы немесе оның төмен түсуі.

Әдетте Y хромосомасы G хромосомаларына қарағанда үлкен болады. Акроцентрлік автосомалардың қысқа иықтарында спутниктер деп аталатын түрінде иықтардың соңғы бөлімдерін бөлетін конструкциялар бар. Осыған байланысты, акроцентрлік автозоманың қысқа қолының морфологиясын зерттегенде оның үш аймағына назар аударылады: проксимальды (центромеральды), спутниктік филаменттер мен спутниктер. Ықтимал, D- және G-топтарының хромосомалары жерсеріктерді алып жүреді, бірақ әдетте спутниктермен анықталған хромосомалардың саны 10-нан аз болады. Бұл сан осы адам үшін салыстырмалы түрде тұрақты, бірақ жасушадан жасушаға дейін өзгеруі мүмкін және хромосоманың конденсация дәрежесіне, дайындықтағы позициясына және түсіне байланысты және басқа тармақтар.

**8.3 Адамның хромосомаларын морфометриялық сәйкестендіру**

Хромосомалардың морфометриясында үш негізгі параметр қолданылады: микрометрде (La) көрсетілген абсо-люттік ұзындық, салыстырмалы ұзындық, ол пайызбен (Lr) көрсетілген, және ортомалық индекс қысқа иық ұзындығының бүкіл хромосоманың ұзындығына қатынасы, пайызбен (Ic).

Хромосомалардың морфометриясы кезінде оларды сәйкестендіру мақсатында бірқатар қиындықтарға тап болады, олар хромосомалардың ұзындығының өзгергіштігін туындатады, олардың анафазаға жолдарындағы табиғи қысқаруымен, бірақ негізінен колхициннің конденсациялаушы әсерімен байланысты.

Ең алдымен хромосомалардың абсолюттік ұзындығы өзгереді, және әртүрлі метафаздарда жасушалар қозғалысының асинхрондылығына байланысты бір хромосоманың циклі бойынша әртүрлі ұзындығына ие. Сондықтан бірнеше метафазаларда өлшеу жүргізу кезінде оларды қысқарту дәрежесі бойынша жақындары таңдаған жөн.

Хромосоммен салыстырғанда абсолюттік ұзындығы емес, салыстырмалы пайдалану дұрыс. Екінші қиындық мөлшері бойынша әртүрлі хромосомалар конденсациясының біркелкі еместігімен байланысты, ал жеке хромосомада – иықтың ұзындығы бойынша әртүрлі: ұзын хромосомалар (иықтар) неғұрлым қысқаірек дәрежеде қысқарады. Осы себепті, хромосомалардың қысқару дәрежесі бойынша әртүрлі метафаздарда бір хромосомалар әртүрлі салыстырмалы ұзындықтағы және әртүрлі орталық индексімен сипатталатын болады. Сондықтан хромосомалардың сызықтық параметрлерін анықтау оларды сәйкестендіру мақсатында метафазды пластинкаларда тек жақын ғана емес, сонымен қатар оңтайлы (орташа) конденсацияда жүргізілуі тиіс. Табл. 1 және 2 хромосомалардың жиынтық ұзындығына F тобының хромосомаларының жиынтық ұзындығының қатынасы 30% - ға жуықты құрайтын хромосомалардың конденсациясының осындай дәрежесі кезіндегі сызықтық параметрлер келтірілген. B, C, D, F және G топтарында хромосомаларды өлшеу, онда жекелеген жұптарды көзбен шолып сәйкестендіру өте субъективті, иықтың жалпы ұзындығы мен өлшемі бойынша осы топтарда жеке хромосомалардың бөлінуінің мүмкін еместігін растады. Бұл гомологиялық хромосомалардың өзгергіштігі мен сызықтық параметрлерінің жоғары деңгейімен байланысты. K. Patau (1965) бағалауы бойынша гомологтардың жалпы ұзындығының вариация коэффициенті шамамен 5,3% құрайды. Хромосомалар қатарында екі көрші екі нақты айырмашылық 10%-ға тең болса да, бұл хромосомалар гомологтар вариациясының жоғары коэффициентінің салдарынан жасушалардың 15% - да анық ажыратылуы мүмкін емес.

2-кесте

Біркелкі боялған хромосомалардың сызықтық параметрлері *(*А. А. Прокофьевой-Бельговской бойынша, 1969)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Параметр | Хромосома тобы мен нөмірі | | | | | | | | | | | | | | | | |
| А | | | В | С | | | | | | D | E | | | F | G | Y |
| 1 | 2 | 3 | 4-5 | 6 | X-7 | 8 | 9 | 10-11 | 12 | 13-15 | 16 | 17 | 18 | 19-20 | 21-22 |  |
| Центромер-лі индекс, % | 49±2 | 38±3 | 47±3 | 29±3 | 37±3 | 39±4 | 39-40±3 | 35-36±3 | 33±3 | 29±3 | 18±4 | 40-41±3 | 34±3 | 29±3 | 45±3 | 25±3 | 18±4 |
| Салыстырмалы ұзындығы, % | 83±5 | 82±5 | 65±4 | 62±4 | 56±3 | 53±4 | 44±3 | 45±3 | 45±3 | 45±3 | 33±3 | 28±3 | 27±3 | 25±3 | 23±3 | 18±3 | 22±4 |
| Абсолютная длина, мкм | 11,0 | 10,8 | 8,3 | 7,7 | 7,2 | 6,8 | 5,7 | 5,8 | 5,8 | 5,8 | 4,2 | 3,6 | 3,5 | 3,2 | 2,9 | 2,3 | 2,8 |
| Ескертпе:  1Хромосомалар конденсациясының оңтайлы дәрежесі бар хромосомалық жиынтықтарға арналған параметрлердің мәндері және олардың шектері берілген.  2. Топтағы жеке хромосомаларды сәйкестендіру шартты және толық емес қазіргі сәйкестендіруге сәйкес келеді. | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Адамның хромосомаларын өлшеу нәтижелерін кариограмма арқылы көрсетуге болады, яғни екі координаталық жүйеде әрбір хромосоманың графикалық бейнесі, біреуі үшін хромосоманың салыстырмалы жалпы ұзындығы әдетте қызмет етеді, ал екіншісі - центромерикалық көрсеткіш. Мұндай екі өлшемді кеңістікте әрбір хромосома нүктеге ұқсайды. Екіге жататын нүктелер бір-біріне жақын орналасқан, өлшенген параметрлер бір-біріне жақын орналасқан. Көрнекі түрде анықталатын хромосомалардың кариограммада нақты кластерлері бар, оларды басқа хромосомаларға айту мүмкін емес.

**8.4 Метафаза тақтасындағы хромосомалардың кеңістік орналасуы**

Интерфаза ядросында хромосомалардың реттелген өзара орналасуы олардың препараттарын дайындау кезінде бұзылады. Бұл колхицин мен гипотоникалық ерітіндінің әсерінен митоздық шыбықтың бөлінуі нәтижесінде хромосомалардың өзара қарым-қатынасының өзгеруімен, сондай-ақ, хромосомалардың үш өлшемді күйден екі өлшемді күйге өтуімен, клеткалар шыны слайдқа түскен кезде пайда болады. Алайда, көптеген зерттеулердің нәтижелері көрсеткендей, кейбір хромосомалардың таралған метафаза тақтасында орналасуы кездейсоқ емес және интерфаза ядросында олардың кеңістіктік орналасуындағы кейбір ерекшеліктерді сақтайды. Бұл мәселені зерттеу жиынтықтың барлық хромосомаларын анықтау әдістерін енгізумен толығырақ болды.

Осы жалпы проблемада көптеген ондаған жұмыстарға арналған акроцентрлік хромосомалардың спутниктік аймақтарының қауымдастығы деп аталатын құбылыс ерекше қарастырылған. Жаңа әдістер енгізілген сайын бірлестіктер мәселесі дамуға жаңа ынталандырулар алып келеді және бұл құбылысты түсіну тереңдей түседі.

Біркелкі боялған хромосомалар бойынша ассоциацияларды сәйкестендіру критерийлері - қысқа қару және олардың арасындағы қашықтық бар акроцентрлік хромосомалардың салыстырмалы бағдары. Бұл қашықтықтың көлемін әртүрлі авторлар әртүрлі жолдармен анықтайды. Жалпы қабылданған ұсыныстардың жоқтығы қауымдастықтардың қол жетімді сандық сипаттамаларында үлкен алшақтықты түсіндіреді. Соңғы жылдардағы жұмыстарға назар аудара отырып, акроцентрлік хромосомалардың ассоциацияларын келесі белгілермен сипаттауға болады. Барлық он акроцентрлік хромосоманың бірігу мүмкіндігі бар. Бір ұяшыққа ассоциациялардың орташа саны жынысына тәуелсіз тұрақты мән болып табылады; қан лимфоциттері үшін бұл сан 0,91 құрайды. Бірлестіктердің жиілігі біртіндеп және сәл болса да, жасына қарай артады. Қауымдастықтағы хромосомалардың саны әр түрлі болуы мүмкін, екіден онға дейін. Орта есеппен бірлестікте шамамен екі хромосома болады. Қауымдастықта хромосомалар қаншалықты көп болса, соғұрлым ол жиі кездеседі.

D- немесе G-хромосомалардың әртүрлі морфологиялық нұсқалары әртүрлі жиіліктермен біріге алады; Қысқа иықтары немесе айдары бар хромосомалар жиі байланысады. Ассоциациялардың жиілігі мен түрлері индивидтерге байланысты өзгеріп отырады, олар белгілі бір адамға тән сипаттама болады. Бұл жағдай жеке хромосомалар бойынша ассоциациялардың құрамын зерттегеннен кейін пайда болды. Ассоциацияларды түсіндіру үшін өзара негізделмеген екі негізгі гипотеза ұсынылады.

Біріншісіне сәйкес, метафазадағы ассоциациялар ядро түзілуінде олардың нуклеолар ұйымдастырушыларының кооперативті өзара әрекеттесуімен байланысты, интерфаза ядросындағы акроцентрлік хромосомалардың қысқа қолдарының тығыз кеңістіктік орналасуының қалдық көрінісі болып табылады. Екінші гипотезаға сәйкес, акроцентрлік хромосомалардың бірлестігі - бұл нуклеолардың ұйымдастырушысының аймақтарында орналасқан құрылымдық гетерохроматиннің спецификалық емес өзара әрекеттесуі (конъюгация).

**8.5 Жеке хромосоманың өзгерткіштігі**

Гетерохроматинді аймақтарды хромосомаларда локализациялауға мүмкіндік беретін әдістерді қолдана отырып, адам популяциясында хромосомалардың кең тұқым қуалайтын полиморфизмі бар, оларда бірегей гендер жоқ және олардың тепе-теңдік өзгерістері әдетте фенотиптік нормадан ауытқуға әкеп соқтырмайды.

Қалыпты хромосома полиморфизмінің белгілі бір пропорциясын біркелкі боялған хромосомаларда анықтауға болады. Мұндай хромосома нұсқалары әдеттегі деп аталады. Олар төмендегілердің өзгеруімен анықталады: а) 1, 9, 16 автозомалардың ұзын қолтықтарының орталық центрлік аймақтарында орналасқан және тұрақты боялған хромосомаларда екінші ретті кедергілер ретінде көрінетін үлкен гетерохроматин блоктары; б) нуклеолар ұйымдастырушылары және перинуклеолярлы гетерохроматині бар акроцентрлік хромосомалардың 13-15 және 21-22 қысқа иықтары; в) Y хромосомасының ұзын қолының көп бөлігін құрайтын гетерохроматиннің үлкен аймағы. Белгілі бір жоспарлы нұсқаның болуы туралы қорытынды бірнеше жасушаларды талдай отырып жасалуы мүмкін, өйткені техникалық және басқа (кездейсоқ) факторлар акроцентрлік хромосомалардың және Y хромосомасының бұлшықеттерінің қысқа қолдарының қайталану жиілігіне әсер етеді.

1, 9 және 16 автозомалардағы қайталама констракциялар мөлшері әр түрлі болады. Кейбір адамдар үшін бұл аймақтың үлкендігі соншалық, ол ұзын иықтың кеңейтілген, жіңішке проксимальды бөліміне ұқсайды. Екінші конструкциялардың үлкен өзгергіштігі 9 автозомаға, ең аз дәрежеде 16 автозомаға тән. Осы аймақтарда экстремалды варианттардың бар екендігіне күмәндану әдетте ұзын қару-жарақтың (гомологтардың гетероморфизмі) ұзындығы мен морфологиясының айырмашылығына мүмкіндік береді, өйткені гомозиготалар өте кіші немесе өте үлкен аймақтарда сирек кездеседі. Гомологтардың гомоморфизмі анықталған кезде, бояудың арнайы әдістері оның гетерохроматин аймақтарының өзгеруімен немесе хромосомалардың құрылымдық қайта құрылуымен байланысты екенін анықтауға болады. 1, 9 және 16 аутосомалардың күнделікті нұсқаларының өлшемдерін шартты нүктелер бойынша бағалауға болады.

Акроцентрлік хромосомалардың қысқа иықтарының өзгергіштігі оның проксимальды бөлігінің, спутниктік жіптің және спутниктің негізгі аймақтарының әрқайсысы үшін бөлек жүре алады. Осы аймақтардың полиморфизмін бағалау кезінде олардың клеткадан жасушаға ауысуы көбінесе техникалық мәселелерге байланысты екенін есте ұстаған жөн, және бұл әсіресе спутниктік және спутниктік филамент мөлшеріне қатысты. Осы аудандардың әрқайсысының көлемін нүктелермен де көрсетуге болады. Алайда, іс жүзінде, барлық үш аймақ біртұтас құрылым ретінде әрекет ететін бірнеше негізгі нұсқалар бар: қысқа иықтың толық немесе дерлік болмауы; орташа өлшемді қысқа қолдар (18 автосоманың қысқа қолынан сәл қысқа); өте үлкен қысқа қол (18 автозоманың қысқа қолына тең немесе одан үлкен). Акроцентрлік хромосоманың белгілі бір дәрежеде оның қысқа білек құрылымымен байланысу мүмкіндігі болғандықтан, жеке полиморфизм ассоциациялардың жиілігі мен сипатына қарай таралады.

Y хромосомасының өзгергіштігі өте кең және ұзын білектің өлшемімен анықталады. Ерлердің көпшілігінде Y хромосомасы G хромосомаларына қарағанда біршама үлкен, бірақ F тобының хромосомаларына қарағанда қысқа болады. Y хромосомасы F хромосомаларына қарағанда кішкентай, кішірек болуы мүмкін немесе керісінше F хромосомаларына қарағанда D хромосомаларына қарағанда D хромосомаларына көбірек келеді. әдебиетте, мөлшердегі нәсілдік айырмашылықтар.

Үнемі боялған препараттардағы басқа хромосомалардың нұсқалары сирек анықталады. Әдебиетте бұзылуға бейім мұрагерлік қысылулар, 2-автосомада, 17 автосоманың қысқа қолындағы терең екінші тарылу және басқа сирек кездесетін нұсқалар сипатталған.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Захаров А.Ф. Хромосомы человека: Атлас АМН СССР / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина, 1982. – 264 с.

2 Ньюссбаум Р.Л. Медицинская генетика: учеб.пособие / Р.Л. Ньюссбаум, Р.Р. Мак-Иннес, Х.Ф. Виллард; пер. с англ. А.Ш. Латыпова; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.

3 Основы цитогенетики человека / под ред. Прокофьевой-Бельковской А.А.. – М.: Медицина, 1969. – 544 с.

4 Абилев С.К. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие / С.К. Абилев, В.М. Глазер. – М.; СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.

5 Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных / С.Е. Мамаева. – М.: Научный Мир, 2002. – 236 с.

6 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / [С.А. Гераськин, Е.И. Сарапульцева, Л.В., Цаценко и др.]; под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М. Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.

7 Смирнов В.Г. Цитогенетика. / В.Г. Смирнов. – М.: Высшая школа, 1991. – 247 с.

8 Шевченко В.А. Генетика человека / В.А. Шевченко, Н.А. Топорнина, Н.С. Стволинская. - М.: ВЛАДОС, 2002. — 240 с.

**9-ТАРАУ**

**МУТАГЕНДІК ФАКТОРЛАРДЫҢ ӘСЕРІНЕН АДАМНЫҢ ТҰҚЫМ ҚУАЛАЙТЫН АУРУЛАРЫ**

**9.1 Аутосома жүйесіндегі сандық бұзылулармен байланысты хромосомалық аурулар**

1963 ж. Kushnik, Massa және Baukema отбасы мүшелерінің бірі бала Gorlin, Anderson және Scott (1961 ж.), сондай-ақ Gorlin және Psaume (1962 ж.) алғаш рет сипатталған ородигитофациальды синдроммен болған отбасын сипаттады. Бұл синдром ауыз қуысы мен бет қаңқасын, саусақтардың аномалияларын, ақыл-ой кемістігінің әртүрлі дәрежесін және т. б. қозғайтын әртүрлі ауытқулардың үйлесуімен сипатталады. Алайда А тобының хромосомалары бойынша тұрақты трисомия тірі адамдарда табылған жоқ, бірақ олар жиі жасанды түсік кезінде эмбрион жасушаларында кездеседі. Тірі адамдарда В тобының хромосомаларының сандық бұзылыстары табылған жоқ. Алайда, осы топтың хромосомаларының құрылымдық бұзылуы сипатталған. С тобының хромосомаларының трисомиясы туралы бірен-саран хабарламалар бар (жыныстардан басқа). Stolte, Evans және Blanckenberg (1964 ж.) туғаннан кейін көп ұзамай көптеген туа біткен ауытқуларға байланысты қайтыс болған 2 бала туған сау әйелді зерттеді. Балалар цитогенетикалық зерттелген жоқ, ал анасында қан мен теріден алынған жасушалардың 30% - ы 47 хромосоманы тапты. Д тобының хромосомаларының бірі трисомиясы бар баланы алғаш рет 1960 жылы Patau, Smith және т. б. тапты және сипаттады. 1 ай жастағы қыз жеткілікті түрде сіңіп кеткен, бірақ оның көптеген ауытқулары бар, олардың арасында жоғарғы еріннің және аспанның бітелуі, сол жақ табанында артық саусақтың болуы, Бас сүйектерінің бітелуі және олардың арасында үлкен аралықтардың болуы, туа біткен жүрек ақауы, кереңдік. 1966 жылы осындай 40-тан астам патологиялық жағдай сипатталып, бұл синдром D-трисомия синдромы немесе Патау синдромы деп аталды. Бұл синдромның жиілігі шамамен 1 14500 тірі туу. Мұндай балалардың өмір сүру ұзақтығы шамамен 100 күнді құрайды.

1960 ж. Edvards қызметкерлерімен Е. тобы бойынша трисомиямен байланысты жаңа синдром туралы хабарлады. Туған қызда (анасы - 31 жаста және әкесі - 32 жаста, дені сау) келесі ерекшеліктер байқалды: тар маңдай және кең оксипитопариетальды диаметрі бар бастың ерекше формасы, кең мұрын, төмен құлағы, емізуді қиындататын кішкентай үшбұрышты аузы, мембраналар арасындағы мембраналар. саусақтарыңызбен. Бала біраз уақыттан кейін қайтыс болды. Цитогенетикалық зерттеу қосымша 47 хромосоманың болуын анықтады (трисомия 18). Бұл аномалиямен ауыру 4500 тірі туылғандарда шамамен 1 құрайды. Сонымен қатар, көп жағдайда мұндай балалар жылдың бірінші жартысында дүниеге келгені айтылды. Көптеген жағдайларда мұндай нәрестелердің аналары радиациялық факторлармен байланысты болды (туа біткенге дейін диагностикалық сәуле қосқанда).

G тобындағы трисомиямен байланысты ең көп таралған синдром - Даун ауруы. Алғаш рет даму аномалиясымен үйлескен ақылсыздықтың ерекше формасын француз психиатры Эскирол 1838 жылы сипаттаған. 1866 жылы ағылшын дәрігері Лангдон Даун бұл ауруды жеке нозологиялық бөлім ретінде бөлді. Эмпирикалық бақылау негізінде пациенттердің туылу жиілігі ананың жасына қарай ұлғаятындығы және пациенттер, әдетте, көп балалы отбасылардағы соңғы балалар болғандықтан, «ана денесінің тозуы» теориясы таралды. Алайда, әлдеқашан ғылыми түйсікке негізделген Даун ауруы хромосома аппараттарының ауытқуларымен байланысты екендігі туралы идеялар көп айтылды. 1958-59 жж бұл жарқын болжамдарды француз генетиктері Лежюн, Гаутье және Турпин растады, олар осы ауруда 47 хромосоманы ашты, ал қосымша хромосома G тобынан (21 хромосома). Бұл аурудың орташа көрсеткіші 700-ге шаққанда 1 құрайды. Ананың жасы мен Даун синдромы бар балалардың тууы арасында тікелей байланыс бар екендігі көрсетілген. Ананың (және әкесінің емес) жасының өсуімен патологиялық балалардың туылу ықтималдығы артады. Бірақ Даун синдромы тек классикалық трисомиядан ғана емес, сонымен бірге G хромосомаларының біреуінің екіншісіне немесе D тобының хромосомасына ауысуы нәтижесінде пайда болады. Даунның осындай аударма түрінде ананың жасына байланысты байланыс жоқ. Геномдық аномалиялардың қандай-да бір мутагендік фактордың әсерімен байланысы орнатылмаған. Трисомиядан басқа (гомологты хромосоманың жұпындағы қосымша хромосома) моносомия да бар (1-ші гомологиялық хромосоманың болмауы). 1960 жылы Лежюн және басқалары көптеген туа біткен ауытқулары, туа біткен жүрек аурулары, ішек және кіндік грыжалары, ақыл-ой дамуы тежелген ұл баланы сипаттады. Цитогенетикалық зерттеулер кейбір жасушаларда 45 хромосоманың болуын көрсетті (21 хромосома жоқ), ал басқа жасушаларда 46 хромосома кішкентай сақина фрагментімен ұсынылған. Аналардың кариотипі өзгермеген. Хромосомалардың құрылымдық өзгеруіне байланысты аурулар. Адамдарда хромосомалардың құрылымдық қайта құрылуы, әдетте, дамудың көптеген ақауларына әкелетін ауыр зардаптарға әкеледі. Жою - өте таралған ауру. 1963 жылы Лежюн және оның алты қызметкері жаңа хромосомалық ауруы бар 3 науқасты сипаттады, ол оны «мысықтың айқайы синдромы» деп атады. Бұл синдром өзінің ауру балалар белгілі бір жасқа дейін шығаратын кекіректің дамуындағы ауытқуларға байланысты мысықтың мауылын еске түсіретін тәндік жылау деп атайды. Басқа белгілер - бұл ауыр ақыл-ойдың дамуы, дамудың өсуі және дамуы. Мұндай балалардың цитогенетикалық зерттеулері кейбір жағдайларда В тобындағы хромосомада бір терминалдың жойылуын, сонымен қатар басқа жағдайларда бір топтағы сақина хромосомасының болуын көрсетті.

**9.2 Жыныстық хромосома жүйесіндегі бұзылулармен байланысты хромосомалық аурулар**

*Жыныстық хромосомалардың саны мен құрылымын бұзу.* Мейоз кезінде жыныстық хромосомалардың дұрыс бөлінуінің бұзылуы жыныстық хромосомалардың өзгерген (қалыптыдан өзгеше) жиынтығы бар гаметалардың түзілуіне әкеледі. Егер мұндай гаметалар зиготаның түзілуіне қатысса, бұл әртүрлі патологиялары бар организмнің дамуына әкеледі. Гаметалық анеуплоидты жыныстық хромосомалардың себебі көп жағдайда мейоз бөлімдерінің бірінің анафазасында немесе бір уақытта екі бөлімде де жыныстық хромосоманың болмауы немесе артта қалуы болып табылады. Мейоздың 1-ші бөліну процестерінің бұзылуының нәтижесінде гаметалар пайда болуы мүмкін, олардың кейбіреулері жұптық жыныстық хромосомадан тұрады, ал басқаларында олар мүлдем жоқ. Мейоздың екінші бөліміндегі әйелдердің денесінде қалыпты жұмыртқалар, сондай-ақ XX хромосомасы жоқ заттар пайда болуы мүмкін. Ерлерде мейоздың екінші бөлімінде ХХ және YY жаңа типтегі сперма пайда болуы мүмкін. Қос қосылыссыз жағдайда (екі бөлімде де) гаметалар жыныстық хромосомалардың одан да күрделі құрамына ие болуы мүмкін. Жұмыртқа құрамында xxx және xxxxx хромосомалары, және XXY, XXYY, XYY ұрықтары болуы мүмкін. Жыныс хромосомаларында YY, YO және OO конституциясы бар зиготалар анықталмады және X хромосомасының болмауына байланысты өлімге әкеледі (X хромосомасындағы нуллисома).

Егер гаметалардың түзілу процесінде жыныстық хромосомалардың құрылымында бұзушылықтар болса, ұрықтандыру кезінде бұл геномдық тепе-теңдік бұзылған зиготаның пайда болуына әкеліп соғады, бұл даму нормасынан әр түрлі ауытқуға әкеледі.

Қайта реттелген Х хромосомасы бар гамета ұрықтандыру кезінде қалыпты Х хромосомасы болмаса, өміршең зиготаны шығара алмайды, өйткені X хромосомасының кез-келген аймағында «нуллисомды» болатын өлімге әкелуі мүмкін.

Жыныстық хромосомалар санының бұзылуымен байланысты жыныстық ауытқуларды 2 топқа бөлуге болады: жыныстық хромосомаларға арналған полисомия (нормадан гөрі, жыныстық хромосомалар саны); жыныстық хромосома моносомиясы (жыныстық хромосомалардың қалыпты санынан азырақ). Айта кету керек, адамдарда жыныстық хромосомалар мен моносомаларға полисомия жиі кездеседі.

*Клайнфельтер синдромы.* Бұл синдром еркек фенотипі бар адамдардағы жыныстық хромосома полисомиясына байланысты. Мұндай адамдарда X- немесе Y-хромосомалар санының нормаларымен салыстырғанда асып кету байқалады, ал кейбір жағдайларда екі хромосома да, яғни X- және Y-хромосомалар. Цитогенетикалық тұрғыдан алғанда, бұл синдромды үш нұсқаға бөлуге болады: 1) Y-хромосома 47, XXY бойынша моносомасы бар Х-хромосома полисомиясы; 48, XXXX; 49, XXXXY; Y-хромосомасындағы полисомия, X-хромосома бойынша моносомия 47, XYY; 48, ХУУУ; 3) X және Y 48, XXYY хромосомаларына арналған полисомия; 49, XXXXYY. Көптеген цитогенетикалық нұсқаларға қарамастан, олар Клейнфельтер және басқалармен сипатталған синдромның ортақ белгілерін (1942) бөліседі. Бұл синдром тек еркек фенотипі бар адамдарға ғана тән, тән белгілері - бұл ұрық бездерінің дамымауы, нәтижесінде әйел денесіне тән бірқатар белгілер пайда болады. Әдетте бедеулік, бірақ балалары бар науқастардың оқшауланған жағдайлары сипатталған. Жыныстық хромосомалардың саны мен арақатынасына байланысты ақыл-ойдың тежелуі де көрінеді.

Әйел фенотипі бар адамдардағы *жыныстық хромосома полисомиясы* (поли-X әйелдер).47, ХХХ әйелдердің көпшілігінде жыныстық ауытқулар болмайды және олардың үштен бірінде қалыпты балалар бар. Осы синдромы бар бірқатар әйелдер бедеулікті бастан кешті. Олардың көпшілігінде аутосомалар мен жыныстық хромосомалар арасындағы дұрыс емес қатынас нәтижесінде эндокриндік тепе-теңдік пен аналық бездердің қызметі бұзылған. Кейде аздап ақыл-ой кемістігі болады. Трипло-X әйелдердің басым көпшілігі психиатриялық ауруханаларда пациенттердің контингентін тексеру кезінде анықталды.

*Шерешевский-Тернер синдромы.* Адамдардағы жыныстық хромосомалардың бір ғана моносомасы белгілі: X хромосомасы XO (45, XO) моносомиясы. Бұл фенотиптік емес әйелдерде кездеседі, бірақ өсу мен жыныстық дамудың, ішкі жыныс мүшелерінің дамымауының кідірісі бар.

Қолданылған әдеюиеттер тізімі:

1 Ньюссбаум Р.Л. Медицинская генетика: учеб.пособие / Р.Л. Ньюссбаум, Р.Р. Мак-Иннес, Х.Ф. Виллард; пер. с англ. А.Ш. Латыпова; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.

2 Смирнов В.Г. Цитогенетика / В.Г. Смирнов. – М.: Высшая школа, 1991. – 247 с.

3 Захаров А.Ф. Хромосомы человека: Атлас АМН СССР / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина, 1982. – 264 с.

4 Основы цитогенетики человека / под ред. Прокофьевой-Бельковской А.А.. – М.: Медицина, 1969. – 544 с.

5 Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных / С.Е. Мамаева. – М.: Научный Мир, 2002. – 236 с.

6 Шевченко В.А. Генетика человека / В.А. Шевченко, Н.А. Топорнина, Н.С. Стволинская. - М.: ВЛАДОС, 2002. — 240 с.

**10-ТАРАУ**

**ЦИТОГЕНЕТИКАЛЫҚ ЗЕРТТЕУ ӘДІСТЕРІ**

**10.1 Микроскоптау**

Хромосомалық зерттеулердің жетістігі көбінесе микроскопияға байланысты. Зерттеуші микроскоптың негізгі сипаттамаларын білуі және оны дұрыс қолдана білуі керек.

Оның негізгі бөлігі болып табылатын микроскоптың оптикалық торабы жарық беру жүйесінен тұрады, оған конденсатор мен айна, түтікпен бірге линзалар мен көзілдіріктер кіреді. Оптикалық түйіннің барлық компоненттері қатаң түрде орталықта болуы керек. Ирис диафрагмасы мен айнасы бар конденсатор микроскоп сатысында орналасқан. Конденсатордың астында жарық сүзгілеріне арналған жалпақ қаңқасы бар ирис диафрагмасы орналасқан. Айна мен конденсатор арқылы препарат жарық сәулесімен сәулеленеді. Содан кейін жарық сәулесі микроскоп револьверінің розеткасында орналасқан линзаға түседі. Микроскоптың оптикалық түйінінің ажырамас бөлігі линзалар деп аталатын көп линзалы жүйелер болып табылады. Линзаның баррельінде жоғарылау байқалады. Цитологиялық дайындықты зерттеу, әдетте, шамалы өсуден басталады. Бұл кішігірім линзаның максималды жұмыс қашықтығы және үлкен көріністі қамтитындығына байланысты. Микроскопта ұсынылатын максималды пайдалы үлкейту 1000x аспайды, сондықтан 90x объективті пайдалану кезінде әдетте 10x немесе 12x көзілдірік қолданылады. Микрофотография кезінде жалпы ұлғаю фотографиялық саптаманың ұлғаюын ескере отырып, объективтің және көзілдіріктің көлемін көбейту арқылы есептеледі. Микроскоп астындағы заттардың мөлшері көзілдірік пен нысан микрометрінің көмегімен анықталады. Бір микроскопта және бірдей үлкейту параметрлерімен микрографтың масштабын анықтау үшін нысан микрометрі алынады. Нысан микрометріндегі кескіндер арасындағы қашықтық 10 мкм болады.

**10.2 Өсімдік тест-объектілерінде қолданылатын цитогенетикалық әдістер**

**10.2.1 Жоғары өсімдіктер жасушаларынан хромосом препараттарын дайындау және бояу әдістері**

*Әдістің принципі.*

*Жұмыс мақсаты*: Кариотиптеу және хромосомалық түзулерді есепке алу үшін тамырдың ұшының меристематикалық тіндері қолданылады, мұнда соматикалық хромосомалар митоз сатысында зерттеледі.

*Реактивтер*: колхицин, этил спирті, мұзды сірке қышқылы, тұз қышқылы, натрий немесе калий метабисульфиті, бояғыштар (ацетокармин, ацето-орцеин, Романовский бойынша азуреосин, Шифф реагенті, фуксульфур қышқылының сулы ерітіндісі және т.б.)

*Материал*: әртүрлі өсімдіктердің тұқымдары

*Үлгіні дайындау:*

*Тұқымның өнуі.* Тұқымдар дымқыл сүзгі қағазына Петри ыдысындағы термостатта t=25-20О С температурада енеді, дәнді дақылдар, пияз және кейбір бұршақ дақылдарының тамырларының ұзындығы 10-15 мм-ге дейін өседі; қызанақ, картоп, қырыққабат және 4-6 мм-ге дейін ұсақ хромосомалары бар басқа түрлер.

*Бекітпес бұрын материалды өңдеу.* Кариологиялық зерттеулер жүргізу кезінде метафаза сатысында мүмкіндігінше көп жасушалар алу қажет. Белсенді бөлінетін жасушалардың популяциясында метафаза плиталарын жинақтау үшін бөліну шыбынына тосқауыл болатын заттар (цитостатиктер) қолданылады, осылайша жасушалардың митоздың анафазасына енуіне жол бермейді. Бұл мақсаттарда экспериментаторлар көбінесе 0,01% концентрациясында колхициннің сулы ерітіндісін немесе монобромонафталеннің қаныққан сулы ерітіндісін пайдаланады. Өңдеу әдетте 3-50 С температурада 3 (үлкен хромосомалар) немесе 16 сағат (кішкентай хромосомалар) үшін жүзеге асырылады. Өңделген материал ағынды сумен жуылады, аздап кептіріліп, ілмекке орналастырылады.

*Бекіту*. Кариологиялық зерттеулерде мұзды сірке қышқылы мен 3: 1 қатынасындағы 96% этил спирті қоспасы әдетте бекітуші ретінде қолданылады, оны бекіту үшін тек жаңадан дайындалған материал қолайлы. Маңызды сәт - бұл бекітілген материалдың бірнеше есе (5-8) асып кетуімен алынған қысқыштың көлемі. Бекітілген материал бетіне құбылмайтын ұстағышқа салынып, түтіктерді бірнеше рет шайқау арқылы ауаны алу керек.Тұрақты материалды тоңазытқышта 4-50 С температурада сақтау керек, бекіту уақыты 12 сағаттан кем болмауы керек. Өскен ұсақ тұқымдар әдетте тұтас болады. Бекітілген материалды ұзақ уақыт сақтау кезінде оны 70% этил спиртінің ерітіндісіне беру керек.

*Мацерация*. Өсімдік тіндерінен цитологиялық препараттарды дайындау кезінде жасушааралық байланыстардың әлсіреуіне және сайып келгенде клетка қабырғасын бұзуға көмектесетін макерацияны жүргізу қажет. Бұл процедура жасушалардың бір қабатын және хромосомалардың бір жазықтықта орналасуын алу үшін қажет. Макерация көбінесе бөлме температурасында 3,0 N тұз қышқылымен 20-30 минут ішінде жүзеге асырылады. Сіз цитаз ерітіндісін қолдана аласыз - жүзім ұлуларының сілекей безінің ферменттерінің қоспасы немесе 5% өнеркәсіптік пектиназа, онда өсімдік материалы 26-320 С температурада 0,5-тен 20 сағатқа дейін сақталады. Емдеу ұзақтығы өсімдіктердің түрлік сипаттамаларына және ферменттердің белсенділігіне байланысты. Екі жағдайда да оңтайлы режимді тәжірибе жүзінде таңдаған дұрыс. Содан кейін материал ағынды ерітінділерден жуылады және сығылған препараттар 45% сірке қышқылының тамшысында дайындалады.

*Бояғыштарды дайындау:*

*Ацетокармин дайындау*. 3-5 г кармин 100 мл 45% сірке қышқылында ерітіліп, су ваннасында 1 сағат қайнатылады. Қайнау рефлюкс конденсаторы бар колбада жүзеге асырылады сірке қышқылының ұшуы бояудың енуін азайтады. Қайнағаннан кейін, ерітінді суығаннан кейін шайқаңыз және сүзіңіз. Бояу үшін қажет көлемде бояудың қоюлауын алу үшін 0,01% темір хлоридінің 1-2 тамшысын қосуға немесе металл қыстырғышты немесе батырманы қоюға болады.

*Фуксин күкіртті қышқылдың су ерітіндісін дайындау.* 270 мг фуксин күкіртті қышқыл кем дегенде 30 минут бойы магнитті араластырғышта 50 мл дистилденген суға ерітеді. Қараңғы ыдыста және қараңғыда сақтаңыз. Пайдаланар алдында сүзіңіз*.*

*Күкірт суын дайындау.* Күкірт суын дайындау үшін 10 мл 1Н НС1, 10 мл 10% калий немесе натрий метабисульфитін, 200 мл су құбыры суын алады.

*Дайындау 1Н HCl.* 82,5 мл ұшы.НС1 (уд.в. 1,19) тазартылған сумен 1 литрге дейін жеткізу.

*Жұмыс барысы:*

1. Бояу.

1.1 Ацетокарминмен бояу. Зерттелетін материалды (түбіршектерді) бір тәулікке және одан да көп бөлме температурасында бояғышта қалдырады, содан кейін 45% сірке қышқылын (бояу көлемінің үштен бір бөлігі) қосады және тоңазытқышқа қояды.

1.2 Фуксин күкіртті қышқылдың су ерітіндісімен бояу

– Бекітілген материал құтыдан алынады және дистилденген судың 3 порциясында мұқият жуылады.

– Келесі қадам - суық гидролиз. Ол үшін материал 1: 1 HCl сумен сұйылтылған (тоңазытқышта алдын-ала салқындатылған) орналастырылады және 40 С температурада 40-50 минут ұсталады, пурин негіздерінің әлсіз қышқыл гидролизі нәтижесінде ДНҚ молекуласында бос альдегидтер топтары пайда болады. Фуксульфур қышқылы альдегидтер топтарымен әрекеттеседі және қызыл-күлгін түсте хромосомаларды доғарады.

ДНҚ молекуласындағы пурин негіздерінің әлсіз қышқыл гидролизі нәтижесінде бос альдегид топтарының түзілуі жүреді. Фуксульфур қышқылы альдегидтер топтарымен әрекеттеседі және қызыл-күлгін түсте хромосомаларды доғарады.

– Гидролиз аяқталғаннан кейін материал HC1-ден бірнеше дистилденген суда мұқият жуылады, содан кейін сүзгі қағазымен аздап кептіріліп, фуксульфур қышқылының сулы ерітіндісіне салынып, кемінде 12 сағат ұсталады.

– ДНҚ-мен реакцияланбаған бояуды кетіру үшін түрлі-түсті материал жаңа дайындалған күкірт суға үш рет кезекпен орналастырылады. Күкірт суының әр бөлігінде материал -15-20 минут ұсталады.

– Міндетті рәсім - бұл жасушааралық зат пен жасуша қабырғасының бұзылуы. Ол үшін ферментативті макерация жүргізіледі. Ол үшін қарқынды боялған тамырдың ұштары, олар белсенді түрде бөлінетін аймақ (1-2 мм), скальпельмен мұқият кесіліп, цитазамен сұйылтылған, планшеттің саңылауларына 1: 1 қатынасында сумен сұйылтылған (немесе 5% пектиназа) және сақталады. 40-60 минут. Сондай-ақ, мацерация 3,0 N тұзды қышқылмен бірге жүреді, тамырларды 20-30 минут ұстайды.

– Материал ферменттерден сумен мұқият жуылады. Ол үшін фермент тамшуырмен сорылып, планшеттің ұяларына су қосылып, бірнеше рет жасайды.

2. Уақытша ұсақталған цитологиялық препараттарды дайындау.

Ферменттен жуылған түрлі түсті зат шыны слайдқа 45% сірке қышқылының тамшысына салынып, қабықпен жабылған. Содан кейін сүзгіш қағаз шыныдан жасалған тіндерді тегістеуге тырысып, ине немесе қарындаштың қарама-қарсы ұшымен мұқабаға жабылады. Содан кейін жеңіл соққылармен және дөңгелек қозғалыстармен олар жасушалардың біркелкі бөлінуіне қол жеткізеді және жасуша монолайерін алады. Жасушалардың бір қабатын алудың белгісі - бұл ашық қызғылт дақтың пайда болуы. Ал соңында препарат орналасқан қаптаманы бас бармақпен басып, 0,5-1 минуттай ұстайды, бұл хромосомалардың жақсы таралуына ықпал етеді. Қаптаманың жылжып кетуіне жол бермеу керек, өйткені бұл жасушалардың жабысып, бұзылуына әкелуі мүмкін. Алынған препарат сірке қышқылы мен ауаның құбылмауы үшін парафинмен немесе глицеринмен өңделуі керек.

3. Тұрақты препараттарды дайындау үшін жоғарыда көрсетілген жолмен алынған цитологиялық препараттар 24 сағат бойы -74±1o температурасы бар тоңазытқышқа орналастырылады. Содан кейін мұздатылған өнім әйнектен босатылып, сусыздандыруға арналған батареямен шайылады, содан кейін препараттарды бөлме температурасында ұзақ уақыт сақтауға болады.

4. Хромосомалардың құрылымдық бұзылуларын есепке алуды жарық микроскопында хромосомаларды талдаудың метафазды, ана-телофазды әдісі арқылы жүргізеді. Әр нұсқада 400-500 метафаза қарастырылады. Хроматикалық аберрацияны талдауда бұзылулардың жалпы саны, құрылымдық бұзылулардың барлық түрлері, яғни хромдық және хромидті жағдайлар ескеріледі. Теріс бақылау ретінде біз әсерге ұшырамаған тұқымның өсіп келе жатқан тұқымының тамырындағы жасушалардағы нақты мутация процесінің көрсеткіштерін аламыз. Позитивті бақылау - бұл стандартты мутагендермен (мысалы, метил метанесульфонаты) туындаған индуктивті аберрациялар деңгейі.

**10.2.2 *Allium*-тест**

*Әдістің принципі.* Әдіс Allium cepa өсімдігі - пияз негізінде химиялық және физикалық табиғат факторларының мутагендік, митоздық ынталандырушы және уытты әсерін зерттеуге негізделген.

*Жұмыс мақсаты*: Пияз тамыры өскіндерінің меристематикалық тіндеріндегі уытты (тамырлы өсу) индукцияны анықтау, митозды-модификациялау (меристеманың митоздық белсенділігінің бұзылуы, шыбық бөлінуінің патологиясы) және мутагендік әсерлер (микроэлементтер мен хромосомалық мутациялардың индукциясы)

*Реактивтер*: кармин, этил спирті, мұзды сірке қышқылы

*Материал*: пияз баданалары

*Үлгіні дайындау:*

*Пияздарды дайындау.* Пияздардың орташа салмағы 10-20 г, диаметрі 1,5-2 см болуы керек.Таңдалған пияздар кептірілген болмау керек. Эксперимент басталғанға дейін жасыл жапырақтарды өсіретін баданаларға рұқсат етілмейді..

*Фиксатор:* 3: 1 қатынасында этил спирті және мұзды сірке қышқылы.

*Ацетокармин дайындау:* 45 мл мұз сірке қышқылында 1-2 г карминді және 55 мл дистилденген суды еріту. Ерітуді кері тоңазытқышы бар колбада су моншасында 3 сағат бойы қыздырылып жүргізу керек. Кері тоңазытқыш болмаған жағдайда колбаға құйғышты қою керек. Салқындағаннан кейін карминнің қою қызыл ерітіндісін сүзіп, қақпағы бар ыдысқа салыңыз.

*Жұмыс барысы:*

1. Пияз 3 күннен 4 күнге дейін өсеріледі. Диаметрі 1,5 см және биіктігі 10 см сыйымдылықтарды пайдаланған жөн, тамырдың өсу шамасына қарай олар орналасқан ыдыстың түбіне тірелмеуі үшін.

2.Ана-телофазды талдау жүргізу үшін ұзындығы 1 см болатын түбіршіктің бір бөлігін алады.

3. Бекіту рәсімін жүргізеді (ұзақ уақыт сақтау үшін). Бекіту үшін түбіршектерді бекіткіші бар сыйымдылықтарға орналастырады. 1-2 күн ішінде жасушаларды бекітеді. Содан кейін материалды фиксатордан 70% спиртпен 2 рет жуады және 70% спиртті ыдыстарға салады, онда материал ұзақ уақыт сақталуы мүмкін. Спирт материалдан көлемі бойынша 4-5 есе асып түсуі тиіс.

4. Түбіршектер 2% ацетокарминмен боялады. Ол үшін түбіршектерді суда жуады, пробиркаға апарады және 2/3 бояғышпен толтырады. Препаратты ацетокармин ерітіндісіне бояуды жеделдету үшін темір ацетатының бірнеше тамшысын (немесе металл қыстырғышты) қосады. Пробирканы спиртовканың жалынының үстінде қайнағанға дейін (пробирканың ағуы) абайлап қыздырады. Материалмен пробирканы хромосомамен бояу үшін біраз уақытқа қалдырады (2 сағаттан 1 тәулікке дейін).

5. Уақытша сығымдалған дәрілерді өндіру. Мұны істеу үшін 2-3 мм ұзындықтағы меристеманың ұшы пышақпен боялған тамырдан кесіледі (ұшы қараңғы түске және қалыңдауға байланысты ерекшеленеді), 45% сірке қышқылы әйнек слайдына тамшыға салынып, қабықпен жабылған және жасушалардың моноляторы алынғанша ақырын үгітілген.

6. Препараттар жарық микроскопымен хромосома санына талдау жасау үшін анафаза-фазалық әдісті қолдана отырып талданады.

7. Зерттелетін заттардың митоздық модификациялық әсері немесе цитотоксичность жасушалардың митотикалық белсенділігінің өзгеруімен анықталады. Бұл үшін митотикалық индекс (МИ) () формуласымен анықталады:

(1)

мұндағы П – профаза сатысындағы жасушалардың саны; M - метафаза сатысындағы жасушалар саны; А - анафаза сатысындағы жасушалар саны; T - телофаза сатысындағы жасушалар саны; И – интерфаза сатысында тұрған бөлінбейтін жасушалар.

**10.2.3 Тозаңды тест**

Тозаңды сынау арқылы қоршаған ортаның ластануын бақылау экожүйенің генетикалық тұрақтылығының деңгейі туралы алғашқы ақпаратты береді. Осы әдіспен ластаушы заттардың гаметоцидтік әсерін бағалау кезінде ықтимал генетикалық бұзылыстардың объективті көрінісін жасауға мүмкіндік беретін бірнеше түрлер туралы ақпарат қажет.

*Әдістің принципі.* Бұл әдіс тозаңдардың (гүлденетін өсімдіктердің ұрық жасушалары) ластаушы заттарға әсер ету қабілетіне негізделген. Химиялық мутагендер меиотикалық бөлінудің сатыларының өтуін бұзуы мүмкін, нәтижесінде ұрықтандыруға қабілетсіз стерильді тозаң пайда болады.

*Мақсаты:* гүлді өсімдіктердегі ерлердің генеративті сферасының экологиялық қолайсыз жерлерде ластаушы заттарға әсерін анықтау.

*Реактивтер*: этил спирті, мұздық сірке қышқылы, глицерин, бояғыштар (ацетокармин, ацетоорсейн, грам йодының ерітіндісі)).

*Материал*: гүлденетін өсімдіктер

*Үлгіні дайындау:*

*Өсімдіктер жинағы*: гүлшоғырлар немесе жеке гүлдер алдын-ала ластанған жерлерден таңдалады. Әр түр үшін әр учаскеден 10 өсімдік таңдалады. Талдау үшін антитертер қолданылады, олар жинау кезінде ашық сары немесе қанық сары болуы керек. Өсімдіктер де ластануға бейім емес салыстырмалы түрде таза аймақтан жиналады.

*Фиксация:* жиналған өсімдіктердің антитеридтері материалды Карно фиксаторында (3: 1 - этил спирті: сірке қышқылы) немесе глицерин ерітіндісінде (50% су және 50% таза глицерол) сақтайды.

*Бояу дайындау:*

Йод ерітіндісін граммен дайындауға 2 г калий йодиді 5 мл дистилденген суда қыздыру арқылы ерітіледі, содан кейін ерітіндіге 1 г йод металы қосылады. 300 мл-ге жеткізілген ерітінді қызғылт сары шыны бөтелкеде сақталады немесе қара қағазға оралған.

Ацетокарминді дайындау - 1-2 г карминді 45 мл мұздық сірке қышқылы мен 55 мл дистилденген суда ерітіңіз. 3 сағат бойы қыздырылған су ваннасында рефлюкс конденсаторы бар колбада ерітіңіз.Егер рефлюкс конденсатор болмаса, колбаға ваннаны салыңыз. Салқындағаннан кейін қара қызыл карминді ерітіндіні сүзгіден өткізіп, жерге қақпағы бар шыны ыдысқа салыңыз.

Ацето-Орцеинді дайындау - 1-2 г Орцеинді 45 мл мұздық сірке қышқылы мен 55 мл дистилденген суда ерітіңіз. Су ваннасында 3 сағат қайнатыңыз, салқындатыңыз және сүзіңіз.

*Жұмыс барысы:*

1. Әр өсімдікке жетілген тозаң түйірлерінен жеке дайындық дайындалады. Бір гүлдің балқымалары шайғыштан шыны слайдқа 45% сірке қышқылының тамшысына беріледі, ал үлкейткіш әйнектің кішкентай үлкегішімен тозаң олардан инелерді бөліп шығарады.

2. Бос қабықшалар алынып тасталады, бір тамшы бояғыш қосылады, бәрі инемен араластырылып, қақпақ әйнегімен жабылады..

3. Тозаңды бояу үшін цитоплазма мен ядролармен байланысқан бояғыштар қолданылады: кармин, орцеин және грамм йод ерітіндісі. Егер дақтар йод ерітіндісінде пайда болса, онда 1-6 сағаттан кейін терінің толық түсі пайда болады.

4. Барлық тозаң түйіршіктері M.A классификациясына сәйкес топтарға бөлінеді. Нечкина және В.С. Журкова (3-кесте).

3-кесте

Мутагендік әсерге ұшыраған аумақтарды талдау кезінде тозаң түйірлерінің түрлері (Биологиялық бақылау ..., 2010 бойынша)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № өсім-діктер, түрі | Астық мөлшері | | | | | | | | |
| Қалыпты | | | Ұсақ | | | Ірі | | |
| Жақсы боялған (А) | Әлсіз боялған (Б) | Боялма-ған (В) | Жақсы боялған (Г) | Әлсіз боялған (Д) | Боял-маған (Е) | Жақсы боялған (Ж) | Әлсіз боялған (З) | Боялмаған  (И) |
| - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

5. Стерильді тозаң мөлшері әр өсімдік үшін бөлек анықталады, бұл популяцияның гетерогенділігін ескеруге, содан кейін стерильденген тозаң дәндерінің орташа пайызын есептеуге мүмкіндік береді (формула 2). Әр популяция үшін тозаң дәндерінің жалпы саны 1500-ден 3000-ға дейін өзгереді.

(2)

мұндағы Спн - процент зерттеу аймағындағы зарарсыздандырылған тозаңның пайызы; Ск – бұл бақылаудағы стерильді тозаңның пайызы

**10.3 Жануарларды сынау обектілеріде қолданылатын цитогенетикалық әдістер**

**10.3.1 Зертханалық кеміргіштердің сүйек кемігін жасушаларында хромосомалық атерацияны есепке алу үшін цитологиялық препараттарды дайындаудың әдістемесі (метафаза әдісі)**

*Әдістің принципі.* Бұл әдіс митоз метафаза сатысында зертханалық жануарлардағы сүйек кемігі жасушаларының хромосомаларындағы көрінетін құрылымдық өзгерістерді зерттеуге негізделген. Сүйек кемігінің жасушалары митоздық белсенділіктің жоғары деңгейімен сипатталады, хромосомалық зақымдану жасушаларының стихиялық жиілігі 1,0–2,5% құрайды.

*Жүмыстың мақсаты*: зертханалық жануарлардың сүйек кемігін жасушаларында химиялық қосылыстардың кластогендік, цитогенетикалық белсенділігін анықтау және мөлшерлеу.

*Реактивтер*: колхицин, калий хлориді, натрий цитраты, этил спирті, мұздық сірке қышқылы,Гимза бояғышы немесе ацетоорсеин.

*Материал*: зертханалық кеміргіш сүйек кемігі

*Үлгіні дайындау:*

*Бекіткішті дайындау:* 3: 1 қатынасында этил спирті мен мұзды сірке қышқылын алыңыз. Тәжірибе жасалған күні тікелей пісіріңіз.

*Пәндік шыныларды дайындау:* пәндік шыныларды майсыздандырады және тазартылған суда салқындатады. Препараттарды дайындау кезінде заттық шынылар ылғалды және суық болуы тиіс.

*Бояғышты дайындау:* 1 мл фосфатты-тұз буфері қосылған 5% Гимза бояғыш ерітіндісін (рН 6,8) дайындайды. Дайындалған бояғыш ерітіндісін қолданар алдында тікелей профильдеу қажет.

*Ацетоорсеинді дайындау* – 1-2 г орсеинді 45 мл мұздық сірке қышқылы мен 55 мл дистилденген суда ерітіңіз. Су ваннасында 3 сағат қайнатыңыз, салқындатыңыз және сүзіңіз. Ацетоорсейннің 2% ерітіндісін қолданыңыз.

*Жұмыс барысы:*

1.Сою алдында әр тінтуірдің салмағы анықталды және 100 г дене салмағына шаққанда 1 мл мөлшерінде колхициннің 0,04% ерітіндісі ішке енгізілді. Колхицин қабылдағаннан кейін 1,5-2 сағаттан кейін тышқандар құрбан болды.

2. Сүйек кемігін жануардың нәжісінен 2,2% натрий цитратының ерітіндісімен жуған. Барлық жануарлардан сүйек кемігін іріктеу аяқталғаннан кейін (бөлек центрифуга түтіктерінде) жасушалар 1000 айн / мин жылдамдықпен 5 мин центрифугаланады.

3.Супернатан толығымен алынып тасталды және гипотоникалық ерітінді тұнбаны тарату үшін түтікті сілкіп жатқанда баяу қосылды. Гипотоникалық ерітінді ретінде 1% натрий цитраты немесе 0,56% калий хлориді қолданыла алады. Гипотоникалық емдеу 10-15 минут ішінде 37º С температурада жүргізіледі.

4. Гипотоникалық емнен кейін жасуша суспензиясы 1000 айн / мин жылдамдықпен 5 минут центрифугаланды.

5. Супернатан жойылады. Жауын-шашын этанол мен мұзды сірке қышқылының қоспасында бекітілді (3: 1). Бір бекіту уақыты - 20 минут. Бекітілгеннен кейін жасуша суспензиясы 1000 айн / мин-де 5 минут центрифугаланады. Бекіту үш рет жүзеге асырылады. Бекіткішті ауыстыру аралығында түтіктерді тоңазытқышта сақтау керек.

6. Бекітілген ұяшықтар қалпына келтіріліп, салқындатылған дымқыл слайдтарға суспензия қолданылды. Бекіткішті жағу арқылы құрғатыңыз.

7. Препараттарды тазалаңыз, оларды Гиза бояғышының 5% ерітіндісіне (рН 6.8) 10 минут немесе ацето-орцеиннің 2% ерітіндісімен 30 минут қояды. Түрлі түсті препараттар тазартылған суда жуылады және ауада кептіріледі.

8. Микроскопиялық талдау. Дәрілік заттарды талдамас бұрын, олар шифрланады, ал шифрын ашу осы зерттеуге дайындалған барлық дәрілерді талдау аяқталғаннан кейін ғана жүзеге асырылады.

Талдауға қолайлы метафазаларды таңдау үшін дәрі-дәрмектер аз мөлшерде (x200) қаралады. Үлкен үлкейту (иммерсия объективімен) жеке метафаза тақталарын талдау үшін қолданылады. Тек центромердің толық жиынтығы бар тақталар талданады. Әр аберрация цитогенетикалық талдау хаттамасында көрсетілген. Координаттар (noniuses) барлық талданған жасушалар үшін де, ауытқулар анықталған жағдайда ғана орнатылуы мүмкін.

Жасушалардың пролиферативті белсенділігінің көрсеткіші митоздық көрсеткіш болып табылады, ол қазіргі уақытта митоз сатысында тұрған жасуша популяциясының үлесін көрсетеді. Митоздардың санын әр жануарға 500 түйе санау арқылы анықтау керек. Митоздық индекстің өзгеруі заттан туындаған цитотоксикалық әсерді көрсетеді.

**10.3.2 Микрокертік сынақ**

*Әдістің принципі.* Бұл әдіс сүйек миының эритроциттеріне полихромды микроэлементтерді алуға негізделген*.*.

*Жұмыстың мақсаты:* сүйек кемігінің жасушаларында микронуклеиннің индукцияны анықтау.

*Реактитер*: ұрықтың бұзау сарысуы, бояғыштар (Май-Грюнвальд, Гимза)

*Материал*: зертханалық жануарлардың сүйек кемігі

*Үлгіні дайындау:*

*Бояуды дайындау:* 1 мл фосфат-буферлі тұзды қосып, Джимса бояғышының 5% ерітіндісін (рН 6.8) дайындаңыз. Дайындалған бояғыш ерітіндіні қолданар алдында бірден сүзіп алу керек.

*Жұмыс барысы:*

1. Сүйек кемігін ұрықтың бұзау сарысуымен ұрықтан тазартады, 100 айн / мин жылдамдықпен 5 мин центрифугалайды, содан кейін супернатана алынып тасталады (толығымен).

2. Пастер тамшуырының қабырғаларында тұндыру салдарынан жасушалық материалды жоғалтпауға тырысып, тұнба қалпына келтірілді.

3. Суспензия тамшысын таза, майсыздандырылған заттық шынының бір соңына жағады және жабынды шынының көмегімен (сұйықтық тамшысын қозғалатын жабынды шынының артында орналасқан) жабынды зат шынысына соза отырып жағынды дайындайды.

4. Бояудың алдында препараттарды ауада кептіреді (оларды түнде қалдыруға болады) және Мюй-Грюнвальд және Гимза бояғыштармен екі рет бояады.

5. Микроядерлерді талдау. Микроядер жиілігін жас эритроциттерде негізгі ядроны алып тастағаннан кейін анықтау оңай. Жас эритроциттер полихроматофильді деп аталады (ПХЭ), ал жетілген – нормохромды (НХЭ). Пхэ бояудың әдеттегі әдістерінде цитоплазмадағы рибонуклеин қышқылының жоғары құрамының салдарынан көкшілден күлгін түске дейін бояуы болады. Nhe қызыл түстен сары түске дейін түсті. Сонымен қатар, ПХЭ НХЭ-дан біршама үлкен. ПХЭ әрбір көру өрісінде үлкен ұлғайған кезде (иммерсиямен), бұл ретте пхэ-нің микроядрмен үлесін анықтай отырып есептейді. НХЭ және ПХЭ арақатынасын әрбір жануар үшін 1000 эритроциттер сомасында талдау жолымен анықтайды. ПХЭ және НХЭ арақатынасының өзгеруі тестіленетін заттың цитотоксикалық әсерін көрсетеді. Сондай-ақ микро ядролары бар НХЭ саны да байқалады.

**10.3.3 ДНК-комет әдісі (оқшауланған жасушалардың сілтілі гель-электрофорез әдісі))**

Жекелеген жасушалардың сілтілі гель-электрофорез әдісі немесе ДНК-комет әдісі (comet assay) ксенобиотиктердің зертханалық жануарлардың ағзалары мен тіндеріндегі ДНК-зақымдануды индукциялау қабілетін бағалау үшін қолданылады. Сілтілік нұсқада әдіс ДНҚ-ның бір және екі жақты үзілуі мен сілтілі - лабильді сайттар, сондай-ақ эксцизиялық репарация салдарынан туындайтын апуриндік және апиримидинді сайттар кіретін алғашқы ДНҚ-зақымдануларды интегралды бағалауға мүмкіндік береді.

*Әдіс принципі.* Әдіс ДНҚ тұрақты электр өрісінде әртүрлі қозғалғыштықты тіркеуге және агарозды гельге жасалған ДНҚ-ның лизирленген жасушаларының ықтимал фрагменттерін тіркеуге негізделген. Сонымен қатар, ДНҚ көрсеткіштері зерттелетін ДНҚ зақымдану дәрежесіне байланысты "кометаның құйрығына" ұқсайтын электрофоретикалық ізді қалыптастыра отырып, анодқа қоныс аударады.

*Жұмыстың мақсаты:* ластағыштардың генотоксикалық әсерінің органоспецификациясын анықтау

*Реактивтер*: әмбебап агароза, жеңіл балқитын агароза, фосфатты-тұзды буфер, натрий хлориді, натрий гидроксиді, EDTA-Na2 (Трилон Б), Трис-HCl (Trizma base), диметилсульфоксид (ДМСО), TritonХ100, этил спирті, флуоресцентті бояғыштар немесе Гимза бояғышы (рН 6,8) (Романовский-Гимзе бойынша Азур-Эозин)

*Материал*: зертханалық жануарлардың әр түрлі тіндері мен органдары. Ағзалар мен тіндерді таңдау кезінде зерттелетін заттың токсикокинетикасы және токсикодинак туралы деректерге, сондай-ақ оның ағзаға түсуінің жоспарланған жолына бағдарлануы қажет. Бақылау жүргізу үшін ағзалар/тіндердің тізімі:

а) ішу арқылы түсу кезінде ксенобиотиктер әсерінің алғашқы нысаналарының бірі болып табылатын асқазан;

б) ксено-биотиктер биотрансформациясының негізгі органы болып табылатын бауыр;

в) жасушалары жасушалық циклдің әртүрлі сатыларында орналасқан Белсенді пролиферлеуші мата болып табылатын сүйек миы;

г) ксенобиотиктерді және/немесе оның метаболиттерін шығаруды жүзеге асыратын бүйрек;

д) ксенобиотиктерді және/немесе олардың метаболиттерін тасымалдауды жүзеге асыратын қан жасушалары (баламалы көкбауырға);

е) тік емес генотоксиканттардың әсеріне сезімтал ми.

Зерттеу бауырдың міндетті түрде қосылуымен кем дегенде үш мүшеде/ұлпада жүргізіледі.

*Үлгіні дайындау:*

*Пәндік шыныларды дайындау:* 1% әмбебап (нормада балқытумен) агароза ерітіндісін дайындайды: 50 мл дистилденген суға 500 мг агароза енгізеді. Жүзінді микротолқынды пешке немесе су моншасына орналастырады және қыздырады,бұл ретте ерітінді қайнатпауы тиіс және ақырында гель толығымен мөлдір болуы тиіс. Кедір-бұдырларға қарама-қарсы заттық шынының шетіне 150 мкл агарозды гельді дозатормен жағады. Мөлшерлегіштің ұшымен плашмя гельді бүкіл кедір-бұдырсыз бет бойынша және 3-5 мм кедір-бұдырлы бойынша бөледі. Барлық бетті агарозамен толық толтыру қажет, көпіршіктердің пайда болуына жол берілмейді. Пәндік шыныларды бөлме температурасында кептіреді (2-3 сағат). Жұмыс бетінің жағында агарозаның қабатын оқшаулауды есте сақтау үшін белгі (тек қарындашпен) жасалады. Пәндік әйнектер бөлме температурасында 1 ай бойы сақталуы мүмкін.

*Ағзалар үшін буферді дайындау:* фосфатты-тұзды буферге 20mm EDTA- Na2 және ДМСО соңғы көлемінің 10% қосады. Сонымен, 200 мл фосфат-тұз буферіне 1,17 г EDTA- Na2 және 20 мл ДМСО қосады. Тікелей эксперимент алдында дайындайды, тоңазытқышта 40С дейін салқындатады

*Лизис ерітіндісін дайындау:* Негізгі лизис ерітіндісі: 1 литр ерітіндіге 2,5 м натрий хлориді (146,1 г), 100 мД EDTA- Na2 (37,2 г), 10 мм Tris-HCl (1,2 г) алынады. .) араластырып 700 мл тазартылған су құйыңыз, 8 г NaOH қосып, ерітіндіні күтіңіз (шамамен 20 минут), рН = 10. Алынған ерітіндінің көлемін 890 мл дейін жеткізіңіз. Ерітінді бөлме температурасында 1 ай сақталады. Эксперимент алдында бірден 10% DMSO және 1% TritonX100 лизис ерітіндісіне соңғы көлемнен қосылады. Дайын ерітінді тоңазытқышта 40С дейін салқындатылады.

*Электрофорез ерітіндісін дайындау:* 2 негізгі ерітінді дайындалды - 10 N NaOH (ерітінді А, 500 мл дистилденген суға 200 г NaOH) және 200 мм EDTA- Na2 (B ерітіндісі, 200 мл дистилденген суға 14,89 г EDTA- Na2) ) Ерітінділер бөлме температурасында 2 ай сақталады. Флорездің 1 литр буферіне дейін біз 30 мл NaOH (A ерітіндісі) мен 5 мл EDTA- Na2 (B ерітіндісін) араластырамыз, ақырғы көлемге тазартылған су қосамыз. рН 13 болуы керек. Дайын ерітінді қолданар алдында 40С дейін салқындатылады.

*Бекітетін ерітіндіні дайындау*: 70% этанол ерітіндісі қолданар алдында бірден дайындалады.

*Жұмыс бырысы:*

1. Жатыр мойнының омыртқаларын ығыстыру арқылы жануарды иммобилизациялаңыз. Ағзалар алынып, орган буферінде жуылады.

2. Организмнің шамамен 100 мг ерітіндіге құйылады, 3 мл бірдей буфер құйылады. Суспензияны пробиркаға өткізіп, үлкен тіннің фрагменттерін тұндыру үшін 5 минутқа қалдырыңыз

3. Жасуша суспензиясының жоғарғы қабаты (1,5-2 мл) түтіктерге беріледі және 1000 айн / мин-де 10 мин центрифугаланады. Супернатан жойылады. Жасуша түйіршіктеріне 0,5-1,0 мл салқындатылған буфер қосылады.

4. Шамамен 180 µl жасуша суспензиясы 240 µl 0,5% төмен балқып жатқан агарозамен (t0LMA=370C) араласады. Бұл қоспаны агароз бар шыны слайдқа салыңыз, мұқабамен жауып, мұзға қойыңыз және 10 минутқа қалдырыңыз. Содан кейін қақпақтар мұқият алынып тасталады (шетінен тартып) және слайдтар лизис ерітіндісімен жасушаға салынып, тоңазытқышқа қойылады.

5. Лизис кем дегенде 1 сағатқа жасалады, препараттар лизис ерітіндісінде 24 сағатқа дейін болады.

Әрі қарай барлық әрекеттер қараңғы бөлмеде сары немесе жасыл шамның астында жасалады.

6. Лизис аяқталғаннан кейін шыныны ерітіндіден алып тастайды, сұйықтық ағады, жұмыс істемейтін бетті сүртеді.

7. Электрофорез ерітіндісі көлденең электрофорез камерасына құйылады: алдымен контейнер қуысында, минус туралы, содан кейін плюс туралы, содан кейін қалған ерітінді әйнек слайдтарын 2-3 мм жауып алғанша баяу құйылады. Слайдтар камераның бетіне контейнердің шетіне дәл перпендикуляр орналастырылған. Препараттар ДНҚ спиралын босату және сілтілі лабильді учаскелерді және бір және екі ішекті ДНҚ-ның үзілуін жүзеге асыру үшін аппарат қосылусыз 30 минутқа қалдырылады. Электрофорез 1 В / см және 300 мА дала кернеуінде 20 минут бойы жүргізіледі.

8. Электрофорезден кейін препараттар 15 минут ішінде фиксациялық ерітіндіге жіберіледі. Бөлме температурасында құрғатыңыз. Сіз препараттарды құрғақ, қараңғы жерде 2-4 ай бойы сақтай аласыз.

9. Препараттарды бояу флуоресцентті бояғыштармен (этидиум бромиді немесе пробидиум йодиді, 4,6-диамидино-2-дифенилиндол (DAPI), SYBR Green /, YOYO-1 или акридиновый оранжевый немесе акридинді апельсин), сондай-ақ Гимза (Азур-Эозин по Романовскому-Гимзе) жүргізілуі мүмкін.

10. Микроскопиялық талдау. Микроскопиялық анализдің ұсынылатын үлкейтуі 200-400x құрайды. Әр препарат үшін кем дегенде 100 ДНҚ комета кездейсоқ түрде құйрықсыз талданады. Талдау құрамында кең диффузды «құйрығы» және іс жүзінде жоқ «басы» бар ашық түсті «ДНҚ кометалары» түрінде препаратта анықталған апоптотикалық жасушалар жоқ немесе бөлек есептелмейді.

11. Нәтижелерді талдау. Техникалық мүмкіндіктерге байланысты ДНҚ-кометаларды талдау визуалды түрде немесе мамандандырылған бағдарламалық қамтамасыздандыру көмегімен жүзеге асырылады.

Көрнекі талдауда «ДНҚ кометалары» 0-ден 5-ке дейінгі сандық мәні бар бес шартты түрге бөлінген (28-сурет). Бұл жағдайда ДНҚ-ның зақымдану дәрежесі (3) формула бойынша анықталған «ДНҚ-кометалар» индексі (IDC) түрінде көрінеді:

(3)

мұндағы n0-n5 — әр типтегі ДНҚ кометаларының саны, Σn — есептелген ДНҚ кометаларының қосындысы.

28-сурет - типтік «ДНҚ кометалары». ДНҚ-ның зақымдану деңгейі I-ден V-ге дейін жоғарылайды, бұл ДНҚ «құйрықтардағы» үзілістердің көбеюімен дәлелденеді (класс I: 0-6,0%, класс II: 6,1-17%, класс III: 17,1-35,0%, класс IV: 35,1-60,0% , класс V: 60,1-100,0%) ( L. Giovannelli, 2002)

Мамандандырылған бағдарламалық жасақтама ДНҚ құрылымының тұтастығын сипаттайтын ДНҚ-комета параметрлерін сандық түрде тіркеуге және өңдеуге мүмкіндік береді - құйрықтың ұзындығы, бастың диаметрі, құйрық ұзындығы, басындағы немесе құйрығындағы ДНҚ пайызы және т.б. д. «Каспий» бағдарламасымен (CASPlab, Вроцлав, Польша) жұмыс істеу нұсқаулары 2-қосымшада келтірілген. ДНҚ-ның зақымдануының индикаторы ретінде «құйрық», «құйрықтағы ДНҚ-ның%» немесе олардың өнімі, «құйрық моменті» қолданылады. Сонымен қатар, нәтижелердің репродуктивтілігін арттыру үшін «құйрықтағы ДНҚ%» индикаторын қолдану ұсынылады.

Фактордың генотоксикалық әсерінің көрсеткіші (4) формула бойынша есептелетін зиян индексі (ПИ):

, (4)

Мұндағы ДО – эксперимент тобындағы «% ДНҚ»,

ДК – бақылау тобындағы «% ДНҚ».

Зақымдану индексі 2-ден жоғары, зерттелген ксенобиотиктердің айқын генотоксикалық қасиеттерін көрсетеді.

**10.3.4 Тұқым қуалаушылық есепке алу бойынша тест**

*Әдістің принципі.* Бұл әдіс бірінші меиотикалық бөлінудің диакинесис-метафаза сатысында жануарлардың сперматоциттеріндегі хромосомалардың көрінетін өзара транслокациясын зерттеуге негізделген.

*Мақсаты:* сперматогониялық жасушалардағы хромосомалық түзілістердің индукциясын анықтау.

*Реактивтер*: колхицин, натрий цитраты, этил спирті, мұздық сірке қышқылы,Гимза бояуы

*Материал*: зертханалық жануарлардың сынағы

*Үлгіні дайындау:*

*Бекіткішті дайындау:* 3: 1 қатынасында этил спирті мен мұзды сірке қышқылын алыңыз. Тәжірибе жасалған күні тікелей пісіріңіз.

*Слайд дайындау:* Слайдтар майсыздандырылып, тазартылған суда салқындатылады. Дайындықты дайындаған кезде слайдтар ылғалды және салқын болуы керек.

*Бояуды дайындау:* 1 мл фосфат-буферлі тұзды қосып, Джимса бояғышының 5% ерітіндісін (рН 6.8) дайындаңыз*. Дайындалған бояғыш ерітіндіні қолданар алдында бірден сүзіп алу керек.*

*Жұмыс бырысы:*

1. Сою алдында әр тінтуірдің салмағы анықталды және 100 г дене салмағына шаққанда 1 мл мөлшерінде колхициннің 0,04% ерітіндісі ішке енгізілді. Колхицин қабылдағаннан кейін 2 сағаттан кейін тышқандар құрбан болды.

2. Ұяшықтар бөлме температурасында 2,2% натрий цитратының ерітіндісіне орналастырылады. Туникті 2 өткір пинцетпен алыңыз. Семинарлы түтікшелер бөлініп, 2,2% натрий цитратының жаңа ерітіндісіне жіберіледі. Түтікшелер сперматоциттерді экстракциялау үшін пинцетпен бекітіледі. Түтікшелер «жалпақ» және тұнық болған кезде, жасуша суспензиясы пробиркаға жіберіліп, қалған ұлпалардың фрагменттерін тұндыру үшін 5 минутқа қалдырылады.

4. Содан кейін супернатант таза түтіктерге өткізіліп, 5 минут ішінде 500 айн / мин жылдамдықпен центрифугаланады (баяу үдеумен, демек, 7 минуттық жалпы жүгірісті қолданыңыз).

5. Супернатант алынып тасталады, таблеткаға 3 мл 1% натрий цитратының ерітіндісі (гипотоникалық ерітінді) қосылады, реанимация жасалады және жасушалар гипотоникалық ерітіндіде 370С температурада 10 минутқа қалдырылады.

6. Баяу екпінмен 5 минут ішінде 500 айн / мин жылдамдықтағы центрифуга.

7. Супернатанды алып тастаңыз, қалдықтағы жасушаларды қалпына келтіріңіз. Шамамен 0,25 мл түзеткіш тікелей суспензия жасушаларына қосылады. Содан кейін түзеткіш түтіктің қабырғасы бойымен қалдық көлеміне қарай 1-2 мл қосылады.

8. 5 минуттан кейін жасуша суспензиясы қайтадан центрифугаланады, содан кейін жаңа түзеткішке қайта орналастырылады. Бекіту ұзақтығы - 10 минут. Центрифуга және жаңа түзеткіш қосыңыз.

9. Препараттарды дайындаған кезде жасуша суспензиясы қалпына келтіріліп, 5 см биіктіктен шыны слайдқа қазылады.

10. Ұстағышты жағу арқылы құрғатыңыз.

11. Препараттарды дақтармен тазалаңыз, оларды Джиемса бояғышының 5% ерітіндісіне 10 мин қояды (рН 6.8). Түрлі түсті препараттар тазартылған суда жуылады және ауада кептіріледі.

12. Микроскопиялық талдау. Дәрілік заттарды талдамас бұрын, олар шифрланады, ал шифрын ашу осы зерттеуге дайындалған барлық дәрілерді талдау аяқталғаннан кейін ғана жүзеге асырылады.

Талдауға қолайлы метафазаларды таңдау үшін дәрі-дәрмектер аз мөлшерде (x200) қаралады. Үлкен үлкейту (иммерсия объективімен) жеке метафаза тақталарын талдау үшін қолданылады. Әр ер адамнан кем дегенде 200 метафаза талданады. Әдетте, бірінші меиотикалық бөлінудің диакинез-метафаза сатысында тышқандардың сперматоциттерінде хромосомалардың конъюциясы нәтижесінде пайда болған 20 бивалент болады. Өзара транслокация жағдайында транслокация орындары бар хромосомалар конъюгация кезінде квадривальды құрайды. Кейде үш, төрт немесе одан да көп хромосомалардың көп валентті конфигурациясы сақиналар, тізбектер түрінде байқалады, бұл екі немесе одан да көп өзара транслокациялардың болуын көрсетеді. Бұл жағдайда биваленттердің жалпы саны 20-дан (тышқандарда) аз.

**10.3.5 Зертханалық жануарлардағы меиотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерінің құрылымындағы бұзушылықтарды есепке алу әдісі**

**10.3.5.1 Синаптонемальды кешендердің жалпы препараттарын ұрықтың ұлпаларынан алу әдісі**

*Әдістің принципі.* Бұл әдіс мейоздың І кезеңінде зертханалық жануарлардағы сперматоциттердің хромосомаларының синаптонемальды кешендерінің құрылымындағы көрінетін ауытқуларды зерттеуге негізделген.

*Жұмыстың мақсаты:* Миотикалық хромосомалардың СК құрылымындағы ауытқулардың сынақ құрамымен индукциясын анықтау.

*Реактивтер*: Орташа ине, сахароза, натрий хлориді, параформальдегид, натрий гидроксиді, бор қышқылы, натрий тетрабораты, этилен гликол, хлороформ, поли-L-лизин, фосфат-тұзды буфер, электронды микроскопия үшін - күміс нитраты, иммундық байыту үшін - бастапқы және екінші антиденелер, бояғыш DAPI.

*Материал*: зертханалық жануарлардың сынағы

*Үлгіні дайындау:*

*Жасушаларды таратуға арналған ерітінділерді дайындау:* 1) 0,2 М сахароза ерітіндісі - 100 мл бидистильденген суға 6,8 г сахароза; 2) 50% NaCl ерітіндісі - 100 мл бидай суына 500 мг NaCl.

0,1 М сахарозаға 4% параформальдегидті бекітетін препарат дайындау. Барлық әрекеттер тартыңыз. Магнитті араластырғыш бар плиткаға 70 мл екі дистилденген су құйылған химиялық өлшеуіш шыныаяқ қойылады. 3,4 г сахароза қосылады, ерітіледі. 4 г құрғақ параформальдегид қосыңыз. 100 мл су қосыңыз. Қоспаны 70-800С дейін қыздырыңыз. Параформальдегид тұнбасы толығымен ерігенше 1M NaOH 4-5 тамшысы қосылады. Салқындатыңыз.рН 8.2-ге борат буферімен реттеңіз. Тоңазытқышта сақтаңыз, тек салқындатқышты қолданыңыз (мұздатуды 2 аптаға жіберуге болады).

*Борат буферін дайындау:* 2 ерітінді бидай суына құйылады. 1 шешім - 0,2 М H3BO3 (500 мл суға 6,18 г H3BO3); ерітінді 2 - 0,05 М Na2B4O7x10H2O (1 литр суға 18,08 г Na2B4O7x10H2O). Қолданар алдында 1 және 2 ерітінділер 1: 4 қатынасында араластырылады (рН = 9).

*Жууға арналған буферді дайындау -* фотофланың 0,4% ерітіндісі (этиленгликоль). Қосарланған тазартылған суда 4% фотофло (этиленгликоль) ерітіндісін дайындаңыз. Қолданар алдында 4% запас ерітіндісі борат буферін қолдана отырып, рН = 8,2 түзетілген 0,4% -ға дейін (қатынасы 1:10) сұйылтылады.

*Пәндік шыныларды дайындау:*

*1) препараттарды кейіннен электрондық микроскоппен зерттеу үшін пластикалық жабыны бар шыныларды дайындау.* Пластикалық төсеніш дайындау үшін салмағы 1 г Петри (Falkon) пластикалық кесе кесегін алады және 100 мл хлороформада ерітеді, 1-2 тәулік қараңғы жерде бөлме температурасында герметикалық жабық шыны ыдыста қалдырады. Пластиктен жасалған қаптамасы бар шыныларды дайындау үшін пластик ерітіндісін шыны стаканға құяды және оған таза пәндік шыныларды (1/3 ұзындыққа) 2 сек батырады. Шыныны тігінен 10 минут бойы кептіреді. Тырнаққа арналған лак жұқа жолақпен төселген.

*2) FISH және иммуно бояуға арналған поли-L-лизині бар шыны дайындау.* Поли-L-Лизин ерітіндісін дайындау:0,1% поли-L-лизинді бидистилденген сумен 0,01% дейін (1: 10 арақатынас) ерітеді, 2-80С кезінде тоңазытқышта 3 ай бойы сақтайды. Әйнектерді жабу процедурасы: қолданар алдында бөлме температурасында (18-260С) сағат бойы 0,01% поли-L-Лизин ерітіндісін ұстау, таза пәндік шыныларды (1/3 ұзындыққа) ерітіндіге 5 минутқа тиеу, ауада түнде кептіру, тоңазытқышта сақтау.

*Қоспаларға желім дайындау:* 10 мл хлороформдағы скотч-таспаның бір бөлігін (2 мм) ерітіңіз.

*Жұмыс барысы:*

1. Тұқымдықтар ортаға глутамин жоқ инені салады (370С). Матаны екі жүзбен ұсақтайды. Содан кейін 15 минут ішінде автоматты пипетканың көмегімен жасушаларды гомогениздейді. Алынған жасушалардың суспензиясын центрифугалық пробиркаға апарады және иненің ортасын 10 мл белгіге дейін қосады.

2. 10 минут ішінде 1500 айн / мин центрифугалайды.

3. Тұндыру сұйықтығы құйылады. Тұнбаға 0,2-ден 3 мл-ге дейін иненің ортасын (тұқым массасына байланысты) қосты.

4. Тұнбаны ресуспендиялайды және мұзға салады.

5. Дайындалған заттық шыныға (пластикалық төсенішпен немесе поли-L-лизинмен қапталған) 4-6 тамшы 0,2 М сахарозаны немесе 50% NaCl ерітіндісін (көлемі ~ 6 µl) жағады, клеткалық суспензияны қайта ресуспендиялайды және әрбір сахарозаның тамшысына 1 тамшыдан суспензия (көлемі ~ 2 µl) жағылады.

6. 2 минуттан кейін сұйықтықты шынының жоғарғы бөлігінің 1/3-іне ұқыпты бөледі. Содан кейін шынылар мұзға тартылады. Препараттарды желдеткіштің суық ауа арқылы кептіреді.

7. Препараттарды суық 4% параформальдегидте (0,1 М сахарозада) 6-10 минут ішінде бекітеді.

8. Тіркелген препараттарды үш рет (30 сек) детергент ерітіндісінде 0,4% фотофло ерітіндісімен (этиленгликоль) жуады.

9. Кептірілген препараттар -200С температурада сақталады.

**10.3.5.2 Миотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерін толық дайындауға арналған бояу әдістері**

*Поли-L-лизинмен жабылған синаптонем кешендерінің тоталдық препараттарын иммунокрашалау.* Белоктарды Қос иммундық бояуды бастапқы және қайталама (флуорохромдармен таңбаланған) антиденелердің көмегімен жүргізеді.

1. Шыны үш рет (5 минуттан) фосфатты-тұзды буфер ерітіндісінде (PBS)

2. 8 мкл-ден екі бастапқы антиденелерді жағады, жабынды шынымен жабады және дымқыл Сүзгіш қағазы бар Петриді ыдысқа салады, кото-руюді термостатқа (370С) 2 сағатқа немесе балама ретінде түнде бос-дильникке орналастырады.

3. Шыныны PBS ерітіндісінде үш рет жуады (5 минуттан)

4. 8 мкл екі екінші антиденелерді жағады, Петри тостағанына салады және термостатқа (370С) 2 сағатқа ауыстырылады.

5. Шыныны PBS ерітіндісінде үш рет жуады (5 минуттан), DAPI бояғышымен Victashield жасау үшін 8 мкл орта жағады және қан шынысымен жабады.

Мысалы, МҚ иммуно-бояу кезінде келесі антиденелерді қолдануға болады:

1) СК және хромосомалардың осьтік элементтері 1:250 *(Abcam*, Ұлыбритания) өсіруде SCP3 ақуызына қарсы қоян антиденелерінің көмегімен анықталады. Ретінде қайталама антиденелердің пайдаланады козьи қарсы антиденелер IgG қоян, меченные FITC (*Jackson Immunoresearch,* АҚШ) өсіру 1:400 (бояу ӨЖ-жасыл түс).

2) центромерлер кинетохор ақуыздарына қарсы IgG бастапқы антиденелерін (CREST) пайдалана отырып, 1:500 (*Antibody Incorporated*, АҚШ) және Alexa Fluor 546 конъюгирленген Iggg адамға қарсы екінші ешкі антиденелерін 1:200 (*Invitrogen*, АҚШ) (центромерді қызыл түске бояу) анықтайды.

СК препараттарын иммунофлуоресценттік талдау флуоресцентті микроскоптың көмегімен жүргізіледі. Әрбір торды үш түрлі сүзгілермен 3 рет суретке түсіреді. Содан кейін алынған суреттер Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, АҚШ) бағдарламасында өңделеді: СК жасыл түске боялады, центромерлер – қызыл түске, хроматин – көк түске боялады (29-сурет).

Зертханалық жануарлардың сперматоциттеріне заттардың мутагендік әсерін анықтау үшін І мейоздың профазасында иіс және дипломендер сатыларында СК зерделейді. Зертханалық тінтуірде х және Y хромосомалар арасындағы ішінара синапсиспен 19 аутосом және типтік жыныс биваленті иісі бар. Бұл ретте гомологиялық хромосомалар бір немесе бірнеше хиазмалармен, яғни кроссингер орын алған жерлерде өзара байланысты болып қалады. 30-суретте интактілі тіндердің сперматоциттердің ядросы бар.

СК SCP3 ақуызына антиденелер, баға ақуыздарына антиденелер-CREST тромері (қызыл). Хроматин dapi (көк) бояғышымен боялған, х1000, Bar = 10 μm: ХУ-жыныс биваленті; 1-СК атипті құрылымы, 2-жыныс хромосомының десинапсисі, 3 - сақиналы Х-хромосома; 4 - көпше фрагментация ("катаст-рофа" мейотикалық); 5 - бірлі - жарым фрагменттер; 6-ХУ бивалентпен аутоменттер қауымдастығы, 7 - "жыныс ағзасының" қалыптасуының бұзылуы»

29-сурет-тышқанның сперматоциттерінде НДМГ тудырған СК бұзылуы

*Электрондық микроскопия үшін синаптонемальды кешендердің жалпы дайындықтарын салыстыру.* Пластикалық субстратпен қапталған препараттар электронды микроскопта қаралады*.*

1. Препараттарды контрасттау AgNO3 50% немесе 70% ерітіндісімен жүзеге асырылады. Препараттың бетіне 20 µl AgNO3 жағылады, қабықпен жабылған, сетта бар «Петри» ыдысына салып, су қосыңыз (~ 5 мл), қақпағын жауып, термостатта (560С) 2-3 сағатқа қойыңыз.

2. Боялған препараттар сумен жуылып, ауада кептіріледі.

СК SCP3 (жасыл) ақуызына антиденелер, ақуыздарға антиденелер центромер CREST (қызыл). Хроматин DAPI (көк) бояуымен боялған, х1000, Bar=10 μm

30-сурет - I мейозының алдын-алуының әртүрлі сатыларындағы тышқан сперматоциттерінің жалпақ ядролары

3. Препаратты Жарық микроскопында қарайды, табылған тотальды препараттар СК алмазды немесе металл белгімен кесіледі.

4. Үлкейту стаканының астында кесілген пластикалық шеңберлердің астына су қосыңыз. Пинцетпен бекітілген линза сорғыш желімге малынған, кептірілген және линзаның жабысқақ жағы қалқымалы пластмассадан жасалған кружканың бетіне тиіп тұрады. Егер пластик кетпесе, препаратқа фолий қышқылы қосылып, тазартылған сумен 10 рет сұйылтылады, 3 рет тазартылған суда жуылады. Қоспалар ауада кептіріледі.

5. Электронды микроскоптың көмегімен суретке түсіріп алыңыз.

**10.4 Адам цитогенетикасының әдістері**

**10.4.1 *In vitro* әдісі адамның перифериялық қанындағы лимфоциттер культурасындағы хромосомалық атерацияны есепке алу әдісі**

*Әдістің принципі.* Бұл әдіс метафаза сатысында in vitro-да перифериялық қандағы лимфоциттердің культурасындағы көрінетін хромосома аномалияларын тіркеуге негізделген

*Жұмыстың мақсаты: in vitro*-дағы адамның лимфоциттерінің шеткергі қандағы культурасындағы хромосомалық ауытқулардың индукциясын анықтау.

*Реактивтер*: калий хлориді, этил (метил) спирті, мұздық сірке қышқылы, азур эозин немесе Гимза бояғышы

*Материал*: адамның веноздық қаны

*Үлгіні дайындау:*

*Бекіткішті дайындау:* 3: 1 қатынасында этил спирті мен мұзды сірке қышқылын алыңыз. Тәжірибе жасалған күні тікелей пісіріңіз. Салқындату керек

*Пәндік шыныларды дайындау:* пәндік шыныларды майсыздандырады және тазартылған суда салқындатады. Препараттарды дайындау кезінде заттық шынылар ылғалды және суық болуы тиіс.

*Бояуды дайындау:* 1 мл фосфат-буферлі тұзды қосып, Гимза бояғышының 5% ерітіндісін (рН 6.8) дайындаңыз. Дайындалған бояғыш ерітіндіні қолданар алдында бірден сүзіп алу керек.

*Каррелдің культуралық ортасын дайындау:* 0,8 мл қанға 6,16 мл MEM ортасы(Sigma, США); 1,6 мл белсенді емес бұзау сарысуы; о, 08 мл L-глютамин; 0,08 мл антибиотик ерітіндісі (пенициллин, стрептомицин); 0,15 мл фитогемогглютинин. Осылайша дайындалған шишалар жасушаларды 48-72 сағатқа инкубациялау үшін термостатқа орналастырылады (инкубация аяқталғанға дейін 2 сағат қалғанда метафаза сатысында митозды блоктау үшін 1 мл орта есеппен 0,2 мкг концентрациясында демеколцин ерітіндісі қосылады.

*Жұмыс барысы:*

1. Пациенттен шынтақ көктамырынан қан алады,құрамында гепарин ерітіндісі бар стерильді пробиркаға (ұюды болдырмау үшін 1 мл қанға 200 ЕД) салады.

2. Стерильді жағдайларда қан үлгілерін өсіруге дайындалған Каррель сауыттарына 0,8 мл-ден құяды.

3. Өсіргеннен кейін шишалар түбіне және қабырғаларына жайылып, центрифуга түтіктеріне берілген жасушаларды беру үшін шайқалады.

4. Культура 1000 айн / мин 10 минут ішінде центрифугаланады.

5. Тұндырғыш сұйықтық жойылады. Тұнбаға алдын ала қыздырылған 370С гипотониялық ерітіндіні (0,75 м KCl) қосады, онда тұнбаларды ресуспендиялайды және 30 мин термостатқа (370С) салады.

6. Дақылдарды 1000 айн/мин болғанда 10 минут центрифугалайды.

7. Тұнба гипотоникалық ерітіндінің қалған 1-2 тамшысында қайта қалпына келтіріліп, фиксатор қосылады. Бекітудің алғашқы тамшыларын баяу қосып, шайғышқа мұқият араластыру керек. Сақтауыштың қоректену мөлшерін көбейтіп, оның көлемін 10 мл дейін жеткізіңіз.

8. Центрифугалаумен ұстағышты ауыстыру үш рет жүзеге асырылады. Су ағынды сорғымен соңғы центрифугалаудан кейін супернатанг аспирацияға түсіп, 150-200 мкл жасуша суспензиясын қалдырады.

9. Препараттар жасуша суспензиясын дайындағаннан кейін бірден дайындалады. Қалған фиксация жасушалары мұқият қалпына келтіріледі. Суспензия (0,3-0,4 мл) дайын шыны слайдтарға қазылады.

10. Препараттар азур-эозин немесе Гимза бояуымен 10-15 минут бойына жағылады, содан кейін ағынды сумен жуылады және кептіріледі.

11. Микроскопиялық талдау. Препараттарды талдау иммерсиялық линзада жүргізіледі. Хромосома аберрацияларын тіркеу үшін метафаза тақталары қолайлы деп саналады, олар келесі талаптарға жауап береді:

- барлық хромосомалар ашық түсті және біркелкі шашыраңқы болуы керек;

- көру аймағында бірнеше кездейсоқ (басқа метафазалардан) хромосомалардың болуына жол берілмейді;

- хромосомалардың конденсациялану деңгейі келесі шектерде болуы керек: max-кіші акроцентрлік хромосомалар нақты анықталған құрылымдар түрінде көрінеді, бірақ нүктелер түрінде емес, өйткені бұл жағдайда оларды оңай нүктелік фрагменттер ретінде алуға болады; min хромосомалар екі хроматидке бөлінеді және бір-бірінен бөлек орналасады;

- анафаза құрамына кіретін хромосомалардың метафаза тақтасында болуына жол берілмейді, өйткені оларды жұпталған фрагменттерден ажырату қиын;

- хромосомалардың қабаттасуы көп, әсіресе бойлық плиталары бар тақталар талдаудан шығарылады, өйткені олар алмасу аберациясында қателесуі мүмкін. Хромосомалардың қабаттасуы жағдайында хромосомалардың да, олардың центромераларының да формалары жақсы көрінуі керек;

- анализге 45-47 хромосомадан тұратын метафазалар енгізілген. 45 хромосомадан аз метафазалар екі себепке байланысты ескерілмейді:

1) мұндай жасушалар көбінесе артефактілі сипатта болады, яғни. есірткіні дайындау кезінде метафазаларға механикалық зақымданудың нәтижесі; 2) осылайша дентентрикті жоғалту ықтималдығы (радиациялық әсер маркері) алынып тасталады.

**10.4. Адамның метафаза хромосомаларын дифференциалды бояу әдістері**

Ұзақ уақыт бойы митоздық хромосомалар біртектес құрылымдар ретінде қарастырылды, олардың ерекшелігі центромера орналасуы мен хромосомалардың мөлшері болды. Кейіннен T. Caspersson және оның әріптестері хромосомаларды бояу үшін акричин қышағын пайдаланып, хромосомаларда жолақтар деп аталатын көптеген көлденең сегменттерді тапты (bands). Бұл сегменттер бояудың интенсивтілігімен ерекшеленеді және әр хромосомада белгілі бір жолмен орналасады, бірақ гомологты хромосомаларда көлденең штрихтау үлгісі бірдей. Сонымен қатар, бірдей хромосомалардың сегменттеу сипаты барлық ұлпалар үшін бірдей және дене дамып келе жатқанда өзгермейді. Дифференциалды бояу деп аталатын хромосома сегменттерін осындай іріктеп бояудың практикалық цитогенетика үшін маңызы зор. Хромосоманың сегментациясын анықтаудың әртүрлі әдістері бар.

***Q-бояу*** (QFQ) (ағыл. Quinacrine – акрихин). Бұл әдіс хромосомаларда кезектесетін ашық және қара флюоресцирлеуші жолақтарды анықтайды. Бояғыш ретінде акридин флюорохромдары және оның туындылары – акрихин дигидрохлорид (атебрин) немесе акрихин-иприт қолданылады. Q-бояудың көмегімен адам популяцияларында хромосомалардың жекелеген учаскелерінің жеке вариабельділігін бөліп алады. Q – полиморфизм хромосомалар: 3 және 4 хромосомалардың центромерлік учаскелері; қысқа иықтар мен адамның барлық акроцентрикалық хромосомаларының серіктері 13-15, 21, 22; хромосоманың ұзын иығының дистальды бөлігі Y-сегменті q12 (31-сурет).

31-сурет - Дифференциалды Q-бояу хромосомалардың (46, XY) акрихин-пропилом: метафазная пластинка, жаю, хромосомалардың схемалық бейнесі (А. Ф. Захарова бойынша, 1982)

Хромосомалардың аталған сәулеленетін учаскелері гетерохроматиннің орналасу салалары болып табылады. Бұл сегменттер бір-бірімен байланыстырады және F-Тельц құрады. Оларды интерфазалық ядрода да анықтауға болады. Q-полиморфты хромосомдық сегменттері болып табылады цитогенетическими маркасы-рамиден. Олар жасушалық желілерді, жеке индивидтерді және тұтас популяцияларды сипаттау үшін кеңінен қолданылады. Сонымен қатар, олар бірқатар сот-медициналық және медициналық мәселелерді шешу үшін де пайдаланылады.

*Акрихин-иприт препараттарын бояу.*

1.Акрихин-иприт атауының стандартты фосфатном буфере (PBS) (рН 6,7) дейін концентрациясы 50 мкг/мл.

2. Бояуды 10-20 мин жүргізеді.

3 Препаратты буфердің бірнеше ауысымында жуады және буферге немесе суға ұстайды. Кейде қорытынды үшін сұйықтыққа 20-60% глицерин ерітіндісін қосады.

*Препараттарды акрихинмен немесе атебринмен бояу.*

1. Бояуды 0,1-0,5% акрихин ерітіндісінде 10-20 мин бойы жүргізеді

2. Препарат ағынды суда шайылады.

Жақсы нәтижеге төмен концентрациядағы бояғышты (1-5 мкг/мл) пайдаланған кезде қол жеткізуге болады, кейін препаратты сол бояғышта жуусыз қорытындылай отырып.

*Hoechst 33258 флюорохромымен препараттарды бояу.*

1. Бояуды флюорохром концентрациясы 0,05 мкг/мл теңескен Хенкс ерітіндісінде дайындайды.

2. Бояу 10 минут ішінде жүргізіледі

3. Бояғыштан препараттарды бірнеше рет суда мұқият жуу және препаратты рН 5,5 сірке қышқыл буферіне жасау. Нақты саралауды алу үшін боялған препараттарды 3-7 күн бойы қараңғыда ұстайды.

***G-бояу*** (GTG) (ағыл. Giemsa – Гимза). Бояу әдісі хром препараттарын трипсиннің әлсіз ерітіндісімен алдын ала өңдеуді көздейді, содан кейін препаратты Гимз бояуымен бояады. Бұл ретте гетерохроматинді аудандар қара жолақтармен, ал эухроматинді аудандар - ашық түсті болып табылады. Сурет бойынша сызу, яғни анықталған сегменттердің саны, шамасы және орналасуы, G-бояу Q суретіне ұқсас. Қара боялған G-сегменттер флюоресцирлеуші Q-сегменттерге сәйкес келеді. Гимз бояғыштарымен жақсы боялатын 1 және 16 хромосомаларындағы жарқырамайтын гетерохроматинді орталықромер сегменттері ерекшелікті құрайды, ал Q-бояуда айқын флюоресцирленетін сегменттер 3, 4, 13-15, 21, 22 және Y-хромосоммен G-бояуда қарқындылықпен бөлінбейді. G-боялған метафазды хромосомаларда гаплоидті генге 320 сегмент бөлінеді (32-сурет).

Рис. 32 - Дифференциалды G-бояу хромосомалардың (46, XY) пайдалана отырып, трипсин: метафазная пластинка, жаю, хромосомалардың схемалық бейнесі (А. Ф. Захарова бойынша, 1982)

*G-препараттарды алдын ала өңдеусіз бояу.*

1. Препараттар Романовский-Гимзе бойынша PBS (рН 6,8) азур-эозин ерітіндісімен боялады.

2. Ерітіндінің концентрациясы және препараттардың бояу уақыты стандартты бояғыштың сапасына байланысты және эмпирикалық таңдалуы тиіс.

3. Бояу үшін жаңа препараттарды қолдану ұсынылады.

*G- бояу цезий хлоридін пайдалана отырып препараттарды бояу*.

1. Препараттар 0,2 М CsCl ерітіндісінде +600С температурада 5-30 минут ішінде инкубацияланады . CsCl ерітіндісіндегі препараттарды инкубациялау уақыты олардың сапасы мен сақтау мерзіміне байланысты және оларды эмпирикалық жолмен таңдау керек.

2. Инкубациядан кейін бірден дайындықтар 700, 960, 1000 этанол арқылы жүзеге асырылады.

3. Романовский-Джемса бояғыш ерітіндісімен құрғатыңыз және дақпен тазалаңыз (рН 6.8).

*Трипсинді қолдану арқылы препараттарды G-бояу.*

1. Препараттар 0,025% трипсин ерітіндісіне бөлме температурасында 10-15 секунд ішінде орналастырылады

2. Этил спиртімен жуылады (700, 960, 1000).

3. Романовский-Джиемсаға PBS (рН 6,8) сәйкес дайындалған азур-эозин ерітіндісімен кептірілген және боялған.

Әр 10 мл азур-эозин ерітіндісіне PBS (рН 6.8) үшін 0,02-0,06 мл 0,25% трипсин ерітіндісі қосылады. Дәрілерді бояудың оңтайлы уақыты эмпирикалық жолмен таңдалады.

*Стандартты тұзды ерітінді (GSC) қолдана отырып, G-бояуға арналған препараттар*

1. Препараттар 2xSSC ерітіндісінде (0,03M Na3C6H5O7 + 0,3 M NaCl) 1-2 сағат ішінде +600С температурада инкубацияланады. Препараттардың инкубациялық уақытын 4xSSC ерітіндісімен азайтуға болады.

2 Инкубациядан кейін препараттар этил спирті арқылы өтеді. (700, 960, 1000)

3. Романовский-Джиемсаға PBS (рН 6,8) сәйкес азур-эозин ерітіндісімен құрғақ және дақ.

***R-бояу*** (ағыл. Reverse – керісінше). Бұл бояу түрінде қарама-қарсы G-бояу суреті пайда болады. Бұл әдіс кезінде эухроматинді учаскелер қара боялады, ал гетерохроматинді – ақшыл боялады (күріш. 33). Бояу Романовский-Гимза немесе акридинді қызғылт сары бояумен жүргізіледі. R-бояу кезіндегі сурет акридинді қызғылт сары нұсқаларда спектрінің жасыл және қызыл аймақтарында кезектесетін жарқырайтын сегменттерден құралады. Фототүсірілімнің қара-ақ нұсқасында ол Гимза бойынша R-бояудың суретіне сәйкес келеді.

33-сурет - барий гидроксидін пайдалану арқылы хромосомалармен дифференциалды R-бояу (46, XY): метафазды пластинка, хромосомаларды орналастыру, схемалық сурет (А. Ф. Захаров бойынша, 1982)

*R-T-Романовский-Гимза немесе акридинді қызғылт сары бояғыштарды және термиялық өңдеуді қолдану арқылы препараттарды бояу.*

1. Препараттар Эрл ерітіндісінде +болғанда (рН 6,5) инкубацияланады. Препараттардың инкубация уақыты сақтау мерзіміне байланысты анықталады және бір тәуліктік препараттар үшін 1,5 – 2 сағаттан 10 минутқа дейін айлық ескіру препараттары үшін өзгереді.

2. Бояуды РН 6,7 кезінде Романовский-Гимза бояғышының 4% ерітіндісімен 10 мин бойы жүргізеді.

3. Т-бояуды термиялық өңдеу ұзақтығы көп болғанда алады. Оны талдау үшін 0,01% акридинді апельсин ерітіндісін қолданған жөн. Капризен әдісі және препараттардың әрбір жаңа партиясына жағдай жасауды талап етеді.

*R-барий гидроксидін қолдану арқылы препараттарды бояу.*

1. Бір, екі күндік препараттар Ва(ОН)2, рН 13 аныққан ерітіндісінде +600С температурада 1-5 мин инкубацияланады

2. Препараттар рН 5-те тазартылған сумен жуылады (инкубациядан кейін препараттарды 0,1 М HCl-мен емдеу ұсынылады, содан кейін оларды дистилденген суға жуыңыз)

3. Бояуды 0,1 М NaOH, формамид және тазартылған су (30 мг орсеин 30 мл қоспасы 1:1, рН 10,5 – 11 қатынасында) қоспасында 3 – 5 мин бойы немесе 0,05% "Stains-All" ерітіндісімен формамидте жүргізеді.

4. Препараттарды ағынды суда жуады және кептіреді.

*R-T-акридинді қызғылт сары түсті қолдану арқылы препараттарды бояу.*

1. Препараттар PBS-те (рН 6.5) 85-870С температурада 3-30 минут ішінде инкубацияланады. Термиялық өңдеу уақыты препараттың қалаған түріне және сақтау мерзіміне байланысты болады. Бұл емдеу ұзақтығының жоғарылауымен бояу түрі бағытта өзгереді: R → RT → TC → C. Жаңа препараттар ұзақ өңдеуді қажет етеді. Оңтайлы өңдеу шарттары эмпирикалық жолмен таңдалады.

2. Бояу бөлме температурасында PBS-те 0,01% акридинді апельсин ерітіндісімен 5-10 минут ішінде жасалады.

3. Препараттар буферге салынып, буферге салынған.

***С-бояу*** (GBG) (ағыл. Сonstitutive heterohromatin – конститутивті гетерохроматин). С-бояудың көмегімен конститутивті гетерохроматиннің вариабельді қараңғылық сегменттері хромосоммен центральды аудандарда анықталады, ал эухроматинді бөліктер хромосоммен өте бозарған боялады (сурет. 34). С-бояу препараттардың сілтімен алдын ала өңделуін көздейді, содан кейін 2 сағат ішінде препаратты 65°С кезінде екі мәрте стандартты тұз ерітіндісінде (2xSSC) инкубациялау жүргізіледі. Содан кейін препараттар Гимз бояуымен боялады. Хромосомада оқшаулау бойынша С-хроматиннің 4 түрі бөлінеді:

1 салыстырмалы шағын қараңғыланған блоктары бар центромерлі гетерохроматин;

2 гетерохроматин, аутосоммен 1, 9 және 16 орталықішілік аудандарда орналасқан, анық айқын жеке полиморфизмге ие;

3 гетерохроматин, ұзын иықтың дистальды бөлігінде орналасқан y-хромосомалар, ер жыныстың өкілдерінің шамасы бойынша өзгереді;

4 акроцентрикалық хромосомалардың қысқа иық гетерохроматині.

34-бойынша - барий гидроксидін және стандартты тұз ерітіндісін пайдалана отырып хромосомалармен дифференциалды с-бояу (46, ХХ): метафазды пластинка, хромосомалар салу (А. Ф. Захаров бойынша, 1982)

Бұл әдіс 1, 9, 16 және Y хромосомалық полиморфизмін бағалауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, оны осы хромосомаларда пайда болған құрылымдық қайта құрулардың сипатын егжей-тегжейлі зерттеу үшін пайдаланады. Халықаралық цитогенетикалық номенклатураға сәйкес гетерохроматиннің ұлғайтылған немесе азайтылған блоктары "qh+" немесе "qh-" (h – гетерохроматин) ретінде белгіленеді. Кариотипті жазу" 46, ХХ, 9qh+ " қалыпты әйелде ұзын иығында үлкен гетерохроматинді блогы бар 9 хромосомасының нұсқасы бар екенін хабарлайды.

*С-бояу натрий гидроксидін пайдалана отырып препараттарды бояу.*

1. Бояғанға дейін препараттарды термостатта 2-3 тәулік бойы ұстайды

3. Препараттар 0,2 М HCl-ге 10 мин салады

4. Препараттар дистилденген суда жуылады

5. Препараттар бөлме температурасында 0,07 М NaOH 30-40 с бойы өңделеді.

6. Препараттар 2хЅЅС ерітіндісінде жуылады

7. 2xѕѕс ерітіндісінде препараттардың инкубациясы +650С 18-24 сағат бойы (инкубация уақыты қысқартылуы мүмкін)

8. Этил спиртінде жуу (700, 960, 1000)

9. рН 6,8 кезінде рbs Романовский-Гимза бойынша азур-эозин ерітіндісімен препараттарды кептіру және бояу.

*С-бояу барий гидроксидін пайдалана отырып препараттарды бояу*

1. Препараттарды бөлме температурасында 5-20 мин бойы Ba(OH)2 қаныққан ерітіндісімен өңдейді

2. Препараттар мұқият жуылады.

3. 2XЅЅС ерітіндісінде препараттардың инкубациясы +600С кезінде 1 сағат бойы.

4. Этил спиртінде препараттарды жуу (700, 960, 1000).

5. РН 6,8 кезінде препараттарды Романовский-Гимза ерітіндісімен кептіру және бояу.

***NOR-бояу*** (ағыл. Nucleolar Organizer Region – Ядрошық-Құраушы Аудан – ЯҚА) немесе ***Ag-окраска*** (күмістеу). Осы әдісті қолдана отырып, адамның барлық акроцентрлік хромосомаларының (13, 14, 15, 21, 22) қысқа қолдарында (q12 сегменті - спутниктік талшық) орналасқан нуклеолар құрайтын аймақтар анықталды. Хромосомалардың өздері сары түспен боялған, спутниктік жіптерде акроцентрлік хромосомалардың қысқа иығында, азайтылған металл күмістің түйіндері түріндегі қара нүктелік түзілімдерді көруге болады. Ұрықтардың мөлшері ҰҒЗ белсенділігіне байланысты, ал өлшемдері әртүрлі хромосомалар үшін айтарлықтай өзгереді - байқалмайтын түс болмағандықтан өте үлкен күміс блоктарға дейін (Ag полиморфизмі) (35-сурет). Хромосомалық полиморфизмнің бұл түрі адам геномының 5 жұптық акроцентрлік хромосомаларының әрқайсысының NOR белсенділігін бағалау үшін жартылай сандық 5 баллдық жүйемен бағаланады. Бояудың қарқындылығы келесі тармақтар бойынша бағаланады: 0 - түсінің болмауы, 1 - әлсіз, 2 - орташа, 3 - күшті және 4 - хромосомалардың СОР түсі өте күшті. Бояудың 4-ші түрімен Ag блогының мөлшері хроматидтердің қалыңдығынан едәуір асады. Геномның барлық 10 НОР-ң белсенділігі жеке ҰЗМ баллдарын қосу арқылы ҰБТ-ның жалпы функционалды белсенділігін анықтау арқылы бағаланады. Адам популяцияларында Аг-боялған хромосомалардың өзара жеке полиморфизмі байқалады. Бұл полиморфизм мұрагерлік сипатқа ие және әр түрлі индивидтердегі жеке хромосомаларды бояудың қарқындылығының ерекшелігінде көрінеді.

35-сурет – Селективті Ag-акроцентрикалық хромосомалардың ядрошық құраушы аудандарын бояу: метафазды пластинка (А. Ф. Захаров бойынша, 1982)

*Хромосомалардың ядрошық құраушы аймақтарын Ag-бояу.1 вариант.*

1. 800 мг күміс нитраты (AgNO3) 2 мл Уолпол ацетаты буферінде (сәйкесінше 0,1 М CH3COONa және 0,1М CН3COOH 2:18 қатынасында) рН 3,7 деңгейінде ерітіліп, бұлтты болмай тұрып 25% аммиак ерітіндісімен титрленді.

2. Препараттарды сағат әйнегіне қоюдың алдында дайындалған күміс нитратының 3 тамшысын бейтарап формальдегидтің (рН 7) 3% ерітіндісімен 1 тамшы араластырады. Бұл шешімдердің қатынасы әртүрлі болуы мүмкін.

3. Қоспаның бір немесе екі тамшысы препаратқа жағылады, мұқабамен жабылған.

4. Препараттың инкубациясы термостата +550 – +650С температурада 4 - 45 минут ішінде жүзеге асырылады. Препараттардың инкубация уақыты эмпирикалық жолмен таңдалады; препараттың сапасы микроскоп арқылы бақыланады.

*2 вариант.*

1. Ионсыздандырылған суда AgNO3 50% ерітіндісі дайындалады.

2. Ерітіндінің бір-екі тамшысы препаратқа жағылады және жабынды шынымен жабады.

3. Препаратты ылғалды камерада 18-20 сағат бойы +370С болғанда немесе 2 – 5 сағат бойы +500С болғанда инкубациялайды.

4. Препараттар фазалық-контрасты микроскопта немесе оларды Жарық микро-скоп астындағы Гимзаны бояғышпен қосымша бояғаннан кейін зерттеледі.

**10.4.3 *In situ* флуоресцентті будандастыру немесе FISH**

*Әдіс принципі.* Әдіс метафазды хромосомаларда немесе *in situ* интерфазалы ядроларда ДНҚ өзіндік реттілігінің детекциясына және жағдайын анықтауға негізделген.

*Жұмыстың мақсаты:* көптеген туа біткен даму кемістіктері бар және болжамды хромосомалық ауытқулары бар пробандамдардың хромосомалық патологиясының себептерін анықтау, репродуктивті қызметі бұзылған отбасыларда, клиникалық болжамды микроделеций синдромдары бар (Ангельман, Вилльямс, Вольф - Хиршхорн, Ди Джорджи/del22q11.2, Миллер-Дикер, Прадер-Вилли, Смит-Мадженис синдромдары және т.б.) емделушілерге, сондай-ақ аномалды хромосомалары бар пациенттерге (Ангельман, Вилльямс, Вольф-Хиршхорн, Ди Джорджи / del22q11. 2, Миллер-Дикер, Прадер-Вилли, Смит-Мадженис және т. б. синдромдары), нақты емес табиғат.

*Реактивтер*: тұз қышқылы, пепсин, магний хлориді, натрий хлориді, калий хлориді, натрий гидрофосфаты, калий дигидроортофосфаты, формальдегид, Na3C6H5O7х2H2O, натрий гидроксиді, NP-40, этил спирті, бояғыштар (PI, DAPI), флуоресцентті белгілер.

*Материал*: FISH үшін перифериялық қан лимфоциттерінің, фибробластардың, буккальды эпителий жасушаларының, ам-ниотикалық сұйықтықтың, хорион ворсинінің немесе плаценттің цитогенетикалық препараттары қолданылады.

*Үлгіні дайындау:*

*Тұз қышқылының ерітіндісін дайындау:* HCl 0,2 Н қоспасын дайындау үшін 20 мл HCl (1N) + 80 мл дистилденген су алынады. Бұл шешім бөлме температурасында сақталады. 10 ммоль HCl жұмыс ерітіндісін дайындау үшін 5 мл 0,2 Н HCl алыңыз және 95 мл тазартылған су қосыңыз.

*Пепсиннің жұмыс ерітіндісін дайындау:* 20 мг пепсинге 1 мл дистилденген су қосылады. 0,5 мл құйып, t = -20 ° C температурада сақтайды*.*

*1M MgCl2 ерітіндісін дайындау:* 50,825 г MgCl2х6H2O дистилденген сумен 250 мл-ге дейін реттелді.

*Фосфатты буферлі тұзды дайындау (*PBS*)*: PBS ерітіндісі pH 7,0 (№ 1 және № 2): 1 л буферіне: 0,1 M NaCl (8 г) + 0,003 M KCL (0,2 г) + 0,008 M Na2HPO4 (1,15 г) + 0,00147 M KH2PO4 (0,2 г).

*Формальдегид ерітіндісін дайындау*: 250 мкл 1M MgCl2 –ге 150 мкл формальдегид және 4,5 мл PBS қосады.

*SSC Ерітінділерді дайындау:*

1) 20×SSC: 175,3 г NaCl және 88,2 г Na3C6H5O7х2H2O алады, 800 мл дистилденген суда ерітеді. Ерігеннен кейін дистилденген сумен ерітінді көлемін 1000 мл-ге дейін жеткізу. рН=5,3 арқылы қажетті рН-ге жеткізу. 6 айға дейін бөлме температурасында сақтау керек.

2) 2×SSC: 100 мл 20×SSC алып 850 мл дистилденген суда ерітіледі. Ерітіндінің көлемін 1000 мл-ге дейін тазартылған сумен мұқият араластырады. рН = 7,0±0,2 1М NAOH қолданып, қажетті рН-ге жеткізу. 6 айға дейін бөлме температурасында сақтау керек.

3) 2×SSC/0,1% NP-40: 950 мл 2×SSC және 1 мл NP-40 алып, толығымен гомогенді болғанша араластырыңыз, ерітіндінің көлемін тазартылған сумен 1000 мл дейін жеткізіңіз. рН = 7,0 ± 0,2, 1 M NaOH көмегімен қажетті рН-ге реттеледі. 6 айға дейін бөлме температурасында сақтау керек..

4) 0,4×SSC/0,3% NP-40: Берут 20 мл 20×SSC, 3 мл NP-алыңыз және 950 мл тазартылған су қосыңыз. Толық гомогенизацияға дейін араластырыңыз, ерітіндінің көлемін тазартылған сумен 1000 мл дейін жеткізіңіз. pH = 7.0-7.5, 1 M NaOH көмегімен қажетті рН-ге реттеледі. 6 айға дейін бөлме температурасында сақтау керек.

*Спирт батареяларын дайындау (№ 1 және № 2).* Этил спиртінің 70, 85 және 96% ерітінділерін дайындайды. Спирттер бөлме температурасында герметикалық жабық ыдыстарда сақталады. Егер герметикалығы сақталмаған болса, ерітінділерді ауыстыру.

*Жұмыс барысы:*

1. Препараттарды алдын ала ферментативтік өңдеу (амниотикалық сұйықтықтан басқа, барлық жасушалық дақылдардың препараттары үшін):

1.1. Препаратпен емдеуді бастамас бұрын, 100 мл 10 ммоль HCl (t=37 °C) 0,5 мл пепсиннің ерітіндісін қосыңыз.

1.2. Препаратты пепсиннің ерітіндісіне 37 ° C температурада 5 минут бойы егіңіз.

1.3. Препаратты PBS № 1 буферінде бөлме температурасында 5 минут бойы жуады.

1.4. Препаратты формальдегид ерітіндісінде бөлме температурасында 10 минут бойы инкубациялайды. Ол үшін 100 мкл ерітіндіні гибридизациялау аймағына жағады және жабынды шынымен жабады.

1.5. Препаратты PBS № 2 буферінде бөлме температурасында 5 минут бойы жуады.

1.6. Препаратты № 1 (70, 85 және 100%) спирттер батареясы арқылы әрқайсысында 3 минуттан жүргізеді.

2. FISH өткізу.

Хромосомаға молекулалық ДНК-сынаманың *in situ* гибридизациясы пәндік шынының белгілі шектелген учаскесінде жүргізіледі. Заттық шыныдағы бұл учаскеде метафазды пластинкалары бар жасушалардың жеткілікті саны болуы тиіс.

Суспензияны оңтайлы өсіруге эмпирикалық жолмен қол жеткізіледі. Амниотикалық Сұйықтықтан және хорион ворсинінен жасалған препараттарда FISH орындау кезінде ең көп метафазасы бар аймақты таңдау қажет. FISH арналған Препарат гибридизациялауды орындауға дейін 3 тәулік бұрын дайындалуы және бөлме температурасында сақталуы тиіс. Цитогенетикалық препараттардың сапасын Жарық микроскопында (×200) бағалауға болады. Препаратқа белгілі бір талаптар бар, олардың орындалуы оның сапасына кепілдік береді. Біріншіден, заттық шыныда зерттелетін материалдың тығыздығы жеткілікті жоғары болуы тиіс; екіншіден, метафазды пластинкалардың оқшаулануы, хромосомалардың болмауы; үшіншіден, метафазды пластинкалардың бүтіндігі.

2. Флуоресцентті ДНК-сынаманы дайындау. Реактивтердің флуоресцентті компоненттерімен жұмыс істеу кезінде міндетті шарт – тікелей жарықтандыруға (табиғи және жасанды) жол бермеу. Диагностикада қолданылады: LSI – локус-спецификалық молекулалық ДНК-сынамалар, WCP – тұтасхромосомды ДНК-сынамалар, олигонуклеотидтердің басқа да түрлері.

2.1.1. Гибридизациялық қоспаның компоненттерін (сынама және гибридизациялық буфер) бөлме температурасында ерітеді, содан кейін мұқият ресуспендиялайды, содан кейін 1-3 с бойы центрифугалайды және пе-вертекспен баулайды, бұл процедураны екі рет қайталайды.

2.1.2. Эппендорф-пробиркада гибридизациялық буферді, ДНК-сынаманы және өндіруші фирманың нұсқауларына сәйкес пропорцияда тазартылған суды (гибридизациялық қоспа) араластырады. Цитогенетикалық препараттағы Гибридизация аймағының көлемі гибридизациялық қоспаның көлеміне қатаң сәйкестікке келтіріледі, келесі пропорцияларды сақтау қажет:24×50 мм2 - 10 мкл, 18×18 мм2 - 5 мкл.

3. Алынған гибридизациялық қоспаны вертекспен мұқият араластырады және 1-3 с бойы микроцентрифугада центрифугамен центрифугалайды.

2.2. Коденатурация және гибридизация жүргізіледі:

2.2.1. Алдын ала гибридизациялық камераны және инкубаторды дайындайды. Гибридизациялық камера ретінде көлемі 0,5 дм3 -тен аспайтын, берілген температураны және жоғары ылғалдылықты 1 тәулік бойы сақтауға қабілетті герметикалық жабылатын сыйымдылық пайдаланылуы мүмкін. Будандау кезінде камераны кептіруге жол берілмейді. Камераның қабырғаларын Сүзгіш қағаз қабатымен орналастырады және тазартылған сумен мол ылғалдайды, түбі тазартылған сумен шамамен 0,5 см қалыңдықта толтырады, шыныпрепаратты көлденең жағдайда ұстап тұру үшін штатив салады.

2.2.2. Зертханалық термоплитті қажетті температураға дейін қыздырады (4 кесте).

4 кесте

ДНК-сынамалардың негізгі түрлері үшін FISH өткізу шарттары (А. Д. Политыко бойынша, 2010)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Үлгі | Денатурация температурасы | Денатурация уақыты | Гибридизация температурасы | Гибридизация уақыты |
| WCP | 68-750 | 5 мин | 370 | 18 с |
| LSI | 73-750 | 3-5 мин | 370 | 18 с |

2.2.3. Препараттың гибридизациясы аймағына қажетті сынама көлемін жағады және дереу жабынды шынымен жабады (ауа көпіршіктерінің пайда болуына жол бермеу).

2.2.4. Шынының шеттерін резеңке (каучук) желіммен, аралықтарды қалдырмай желімдейді. Желімнің толық кебуін күтеді.

2.2.5. Препаратты зертханалық термоплит бетіне орналастырады және қажетті температурада коденатурация жүргізеді (3 кесте).

2.2.6. Препаратты дайындалған гибридизациялық камераға көлденең салып, будандаудың қажетті кезеңіне термостатқа салады(3 кесте).

2.3 Препараттарды қысқаша жуу. Гибридизация уақыты аяқталғаннан кейін препаратты жуу жүргізіледі. ДНК-нысанаға нақты сапалы флуоресценттік сигналдарды алу үшін мынадай талаптарды сақтау қажет:

- препаратқа тікелей жарық түсуден аулақ болу;

- жуу ерітінділерінің қажетті температуралық режимін сақтау үшін температураны бақылауды су моншасында да, ерітіндісі бар стакандардың ішінде да орындау;

- жуу ерітіндісінің көлемі 4 препаратты жууға есептелген. Егер жууға препараттардың аз саны ұшыраса, стаканға берілген температуралық режимді қамтамасыз етуге арналған жетіспейтін "балласты" препараттарды салу;

- жуу уақыты соңғы препараттың батырылуынан бастап есептеледі.

2.3.1. Жууға арналған ерітінділерді дайындау: 70 мл 0,4×SSC/0,3%NP-40 (t=73±1°С), 70 мл 2×SSC/0,1%NP-40 (t=20-25°С), 70 мл дистилденген су (t=20-25°С). Күн ішінде жууға арналған ерітінділерді қолданыңыз.

2.3.2. Қаптаманы препараттан алып тастаңыз да, препаратты дереу 0,4×SSC/0,3%NP-40 стақанға салыңыз, 1-3 секунд шайқаңыз. Препаратты 2 минут ішінде жуыңыз.

2.3.3. Препаратты 2×SSC/0,1%NP-40 стақанға салыңыз, 1-3 с шайқаңыз. Препаратты 1 мин жуыңыз.

2.3.4. Препаратты дистилденген сумен стаканға салыңыз, 5 с шайқаңыз.

2.3.5. Препаратты № 2 алкоголь батареясы арқылы әрқайсысына 1 мин үшін 70, 85 және 96% ретпен өткізіңіз.

2.3.6. Препаратты алкоголь буланғанша құрғатыңыз. Кейде кептіруден кейін препараттың бетінде көрінетін пленка пайда болады; ол әдетте флуоресценция бермейді және талдауға кедергі келтірмейді.

2.3.7. Гибридизация аймағына негізгі бояғыш ерітіндісінің 10 мкл мөлшерін жағып, қабықпен жабыңыз. Жасыл немесе аква фторохромдары үшін PI немесе DAPI пайдаланыңыз, қызғылт сары үшін тек DAPI пайдаланыңыз.

2.3.8. Препараттар қараңғы жерде-200С температурада сақталады.

3. FISH цитогенетикалық талдау және нәтижені түсіндіру.

Препаратқа талдау тиісті фильтр жиынтығы бар флуоресцентті микроскопта жүргізіледі. Мақсатты хромосомалардағы флуоресцентті сигналдар қарқынды және нақты құрылымы болуы керек. Сіз мозаика болмаған жағдайда кем дегенде 20-25 метафазаны қарауыңыз керек. Егер мозайцизм болса, онда кариотиптің мозаикалық мәртебесін анықтау үшін кем дегенде 100 метафаза зерттеліп жатыр. Әдетте, метафазалар зерттеледі, онда ДНҚ үлгісін құрайтын басқару флуоресценттік сигналдары гомологиялық хромосомаларға анықталады. Интерфазалық хромосомалардағы сигналдарды талдауға кариотиптің мозаикалық мәртебесін анықтау үшін кем дегенде 50 интерфаза жасушасын, 500 интерфазаны және одан да көп қарау керек. Критикалық аймақтың флуоресценттік сигналдарының жоғалуын / болуын талдау нәтижелерін түсіндірудің мысалы 36-суретте келтірілген.

Цитогенетикалық талдау жүргізілгеннен кейін алынған нәтижелерді хаттамалайды және фотосуреттерді компьютерлік деректер базасына енгізеді.

36-сурет - зерттелетін хромосомада сыни және бақылау локус-спецификалық флуоресцентті сигналдардың орналасуының схемалық бейнесі: А – микроделецияның болмауы, Б-сыни аймақтың микроделециясының болуы (А. Д. Политыко бойынша, 2010)

Кариотиптерді жазу мысалдары. Молекулярлық-цитогенетикалық әдістің көмегімен зерттелген FISH пациенттің кариотипін диагностикалау үшін қолданылған ДНК-сынаманың түрін көрсете отырып, адамның хромосомалары номенклатурасының халықаралық жүйесінің (ISCN) ережелеріне сәйкес жазады.

1-мысал. 47, XY, + mar.ish inv dup(18) (p10) (wcp18+). Жазба білдіреді стандартты цитогенетикалық талдау ер кариотипін анықтады жалпы саны хромосомалардың тең 47, мен тауып, қосымша маркерную хромосому. Бұл ақпаратты жазу нүктемен шектелген. Бұдан әрі интервалсыз ish аббревиатурасы ("in situ hybridization"), одан кейін интервалдан кейін - молекулярлық-цитогенетикалық зерттеулердің нәтижелері: маркерлік хромосома болып табылады, 18р10 центромера нүктесінің айналасында 18 хромосоманың қысқа иығының инвертирленген дупликациясы арқылы пайда болады.

2-мысал. Критикалық бұйраның микроделециясы анықталған жағдайларда кариотипті жазу ережесі:

46,XХ.ish del(7)(q11.23q11.23)(ELN-,LIMKI-,D7S613-)

46,XY.ish del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-)

46,XХ.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-)

Критикалық бұйраның микроделециясы болмаған жағдайда кариотипті жазу ережесі:

46,XХ.ish 7q11.23(ELN×2,LIMKI×2,D7S613×2)

46,ХУ.ish 15q11~13(D15S10×2) 46,XУ.ish 22q11.2(N25×2).

Талдау аяқталғаннан кейін молекулярлық-цитогенетикалық диагностиканың нәтижелері туралы қорытынды ресімделеді.

**10.4.4 Миотикалық хромосомалардың синаптонемальды кешендерінің еркек эякуляты жасушаларынан жалпы дайындық алу әдісі**

*Әдіс принципі.* Әдіс і мейоз профазы сатысындағы ерлер сперматоциттері хромосомаларының синаптонемалық кешендерінің құрылымында көрінетін бұзылуларды зерттеуге негізделген

*Жұмыстың мақсаты:* мейотикалық хромосомалардың синаптонемалық кешендерінің құрылымындағы бұзушылықтарды анықтау.

*Реактивтер*: ине ортасы, сахароза, натрий хлориді, параформальдегид, натрий гидроксиді, бор қышқылы, натрий тетрабораты, этиленгликоль, хлороформ, поли-L-лизин, фосфатты-тұзды буфер, электрондық микроскопия үшін - күміс нитраты, иммундық бояу үшін – бастапқы және қайталама антиденелер, DAPI бояғышы.

*Материал*: ерлер эякуляты

*Үлгі дайындау:* «зертханалық жануарларда миотикалық хромосомалардың синаптонемальды комплекстерінің құрылымындағы бұзушылықтарды есепке алу әдісі» ұқсас

*Жұмыс барысы:*

1. Пациентті 3 күндік қалыс қалу қажеттігі туралы ескертеді.

2. Эякулятты сұйылтуға арналған термостатқа (370С) 30 минутқа орналастырады. Содан кейін 2 пробиркаға апарып, иненің ортасын 10 мл белгіге дейін қосады.

2. 12 минут бойы 1500 айн/мин болғанда центрифугалайды. Супернатан су төгіледі. Тұнбаға иненің 3 мл-ге дейін қосылды, иненің ортасында 20-40 рет ресуспендияланады.

3. 1000 айн/мин болғанда 10 минут бойы центрифугалайды. Супернатан су төгіледі. Орташа мөлшерінен 3 мл дейін және 1 мл ДНҚ-аза (1 мкг / мл) тұнбаға қосылды, 20-40 рет қалпына келтірілді.

4. 1000 айн/мин болғанда 6 минут ішінде 3 рет центрифугалайды. Супернатан су төгіледі. Тұнбаға ине ортасын 3 мл-ге дейін, ине ортасында 20-40 рет қосты.

5. Центрифугалаудан кейін супернатант су төгіледі. Шөгіндіге 0,3 - 3 мл бүркіт ортасы қосылды (ұрықтың салмағына байланысты). Жауын-шашын қалпына келтіріліп, мұз үстіне қойылды.

6. Дайындалған заттық шыныға (пластикалық төсенішпен немесе поли-L-лизинмен қапталған) 4-6 тамшы 0,2 М сахарозаны немесе 50% NaCl ерітіндісін (көлемі ~ 6 µl) жағады, клеткалық суспензияны қайта ресуспендиялайды және әрбір сахарозаның тамшысына 1 тамшыдан суспензия (көлемі ~ 2 µl) жағылады.

7. 2 минуттан кейін сұйықтықты стаканның жоғарғы бөлігінің 1/3 бөлігіне жайлап таратыңыз. Содан кейін стақан мұзға ауыстырылады. Препараттарды суық желдеткіш ауасын пайдаланып құрғатыңыз.

8. Препараттар суық 4% параформальдегидке (0,1 М сахароза) 6-10 минут ішінде бекітіледі.

9. Бекітілген препараттар үш рет (30 секунд ішінде) жуғыш зат ерітіндісінде 0,3% фотофло ерітіндісімен (этиленгликоль) жуылады.

10. Кептірілген препараттар -200С температурада сақталады.

11. Бояу әдістері «зертханалық жануарлардың мейотикалық хромосомаларының синаптонемальды комплекстерінің құрылымындағы бұзушылықтарды тіркеу әдістері» де сипатталған әдістерге ұқсас.

Қолданылған әдебиеттер тізімі:

1 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / [С.А. Гераськин, Е.И. Сарапульцева, Л.В., Цаценко и др.]; под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М. Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.

2 Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. – М.: РАМН, РСНХН, 2006. – 27 с.

3 Пухальский В.А. Практикум по цитологии и цитогенетике растений / В.А. Пухальский, А.А. Соловьев, Е.Д. Бадаева, В.Н. Юрцев. – М.: КолосС, 2007. – 198 с

4 Navarro J. A method for the sequental study of synaptonemal complex by light and electron microscopy / J. Navarro, F. Vidal, M. Quitart // Human. Genet. - 1981. - Vol. 59. – P. 419-423.

5 Kolomiets O.L. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in mole vole (Ellobius talpinus Pallas) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females / O.L. Kolomiets, S.N. Matveevsky, I.Yu. Bakloushinskaya // Comparative Cytogenetics. – 2010. - Vol. 4, № 1. - P. 55–66.

6 Anderson L.K. Distribution of Crossing Over on Mouse Synaptonemal Complexes Using Immunofluorescent Localization of MLH1 Protein / L.K. Anderson, A. Reeves, M.L. Webb, T. Ashley // Genetics. – 1999. - Vol. 159. – Р. 1569-1579.

7 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос, 1980. – 271 с.

8 Захаров А.Ф. Хромосомы человека: Атлас АМН СССР / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина, 1982. – 264 с.

9 Немцева Л.С. Метафазный метод учета перестроек хромосом / Л.С. Немцева. – М.: Наука, 1970. – 126 c.

10 Всемирная организация Здравоохранения Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ: Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. – М.: Медицина, 1989.– 212 c.

11 Турков В.Д. Хромосомные исследования растений в проблемах селекции, клеточной инженерии и генетическом мониторинге: Атлас-пособие / В.Д. Турков, Ю.Л. Гужов, Г.А. Шелепина, Я.Ш. Кишмария, Д.Г. Кометиани. – М.: Изд-во УДН, 1988. – 64 с.

12 Оценка мутагенной активности пестицидов: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. – 49 с.

13 Политыко А.Д. Молекулярно-цитогенетический метод флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) в диагностике сложных форм хромосомной патологии: инструкция по применению / А.Д. Политыко, И.В. Наумчик, О.М. Хурс, Л.В. Исаакович.–Минск, 2010.– 9 с.

14 Giovannelli С. Comet assay as a novel approach for studying DNA damage in focal cerebral ischemia: differential effects of NMDA receptor antagonists and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors / С. Giovannelli, A. Cozzi, I. Guarnieri // J Cereb Blood Flow Metab. – 2002. – V. 22. - P. 697-704.

**11-ТАРАУ**

**ӨЗІН-ӨЗІ БАҚЫЛАУҒА АРНАЛҒАН СҰРАҚТАР:**

**Қоршаған ортаның экологиялық қауіпті факторлары**

1. Экологиялық қауіпті факторлардың 5 негізгі тобын атаңыз (ЭҚФ)

2. Мутагенездің химиялық факторларына қандай ЭҚФ жатады

3. Мутагенездің физикалық факторларына қандай ЭҚФ жатады

4. Мутагенездің физикалық факторларына қандай ЭҚФ жатады

5. Мутагенездің физикалық факторларына қандай ЭҚФ жатады

6. Мутагенездің биологиялық факторларын атаңыз

7. Қандай механикалық экологиялық қауіпті факторлар мутагендік әсерге ие

**Қоршаған ортадағы мутагендер**

1. Экологиялық қауіпті факторлардың мутагендік әсерінің табиғаты қандай?
2. Радиоактивті ластанудың түрлері
3. Химиялық мутагенез. Химиялық мутагендердің әсер ету механизмдері
4. Биологиялық табиғаттағы мутагендер. Әсер ету механизмдері
5. ҚО-да болуы мүмкін мутагендік факторларды атаңыз

**Радиоактивті ластану және радиациялық мутагенез мәселелері**

1. Радиоактивті ластанудың себептері мен көздері
2. Иондаушы сәулеленудің негізгі түрлері
3. Радиацияның табиғи популяцияларға әсері
4. Радиация эволюция факторы ретінде

**Ауыр металдың ластануы және олардың мутагендік әсері**

1. Д.Менделеев кестенің қандай элементтеріне ауыр металдарға жатады (АM)?
2. Ауыр металдарға сипаттама
3. ҚО-ны ауыр металдармен ластаудың себептері мен себептері
4. АМ-дың тірі организмдерге уытты әсері
5. Ауыр металдардың мутагенді әсері

**Пестицидтермен қоршаған ортаның ластануы және олардың мутагендік әсері**

1. Пестицидтер дегеніміз не
2. Пестицидтердің қысқаша жіктелуі және сипаттамасы
3. Әлемдегі және Қазақстандағы пестицидтермен байланысты мәселелер
4. Пестицидтердің уытты және мутагендік әсері
5. Пестицидтік ластанудың табиғи популяцияларға әсері

**Мутагенездің биологиялық факторлары**

1. Табиғи мутагендерді атаңыз
2. ҚО-нЫң биологиялық мутагендермен ластануының себептері мен себептері
3. Өсімдіктектес мутагендер
4. Вирусты табиғат мутагендері
5. Тағамдық қоспалар мутагенез факторы ретінде

6.Мутагендік белсенділігі бар биологиялық табиғаттағы токсиндер

**Қоршаған ортаны ластайтын заттардың мутагендік деңгейін анықтауға және бағалауға арналған негізгі тест-жүйелері**

1. Ластаушы заттардың мутагендік белсенділігін анықтауға арналған негізгі тест-жүйелерін атаңыз

2. Ортаны ластаушылардың мутагендігін анықтау және бағалау үшін тест-объектілер ретінде микроорганизмдер

3. Вирустық тест-жүйелер

4. Бактериялық тест-жүйелер. Эймс Тесті

5. SOS-хромотест

6. Саңырауқұлақтар қоршаған ортада мутагендерді анықтауға арналған тест-объектілер ретінде

7. Сүтқоректілер тест-объект ретінде

8. Адам қанының лейкоциттері-орта мутагендерін бағалауға арналған тест-жүйе

9. Микроядролы тест

10. Қоршаған ортаны ластайтын заттарды анықтау мен бағалауға арналған көп компонентті тест жүйелері

11. Ортаны ластаушылардың мутагендігін анықтау және бағалауға арналған өсімдік тест-жүйелері

12. ҚО мутагендерді анықтаудың цитогенетикалық әдістері

**8 тақырып. Адамның цитогенетикасының негіздері**

1. Адамның кариотипі қалыпты
2. Адам хромосомаларының классификациясы және номенклатурасы
3. Хромосомалардың сандық сипаттамалары
4. Жыныстық хромосомалар
5. Хромосомалардың құрылымындағы өзгерістер
6. Жасы бойынша кариотиптің өзгеруі

**9 тақырып. Адамдағы мутагендік факторлар**

1. Адами ортадағы ықтимал мутагендер
2. ҚО мутагендік факторларының әсерінен гендік мутация
3. Геномдық бұзылыстардың түрлері (анеоплоидия, полиплоидия)
4. Құрылымдық бұзылулардың түрлері (хромосомалық және хроматидтік типтегі бұзылулар)
5. Мутагендік факторлардың әсеріне организмнің сезімталдығы

**10 тақырып. Хромосомалық аурулар: аутосома жүйесіндегі бұзылулар**

1. Хромосомалардың сандық өзгеруіне байланысты аурулар
2. Геномдық мутациялар, адамдағы өлім факторы
3. D-трисомии синдромы
4. 18 трисомия
5. Даун ауруы
6. Құрылымдық хромосоманың ауытқуларынан туындаған аурулар
7. Аутосомалық ауытқулардағы өлім

**Цитогенетиканың ғылым ретінде қалыптасуы мен дамуы**

1. Цитогенетиканың қалыптасу және даму тарихы

2. Цитогенетиканың дамуына үлес қосқан ғалымдар қандай

3. Цитогенетиканы зерттеудің пәні мен нысаны қандай?

4. Цитогенетикалық зерттеулердің қазіргі бағыттары

**Хромосомалардың құрылысы мен қызметі**

1. Эукариот жасушасының хромосомаларының құрылысын сипаттаңыз
2. Метафаза хромосомасының морфологиялық ерекшеліктерін анықтаңыз
3. Хромосоманың центромера аймағының рөлін түсіндіріңіз
4. Хроматидтер дегеніміз не
5. Хромомерлер дегеніміз не

**Хромосоманың құрылымдық ауытқулары**

1. Мутацияның қандай түрлерін білесіз
2. Хромосома типті құрылымдық қайта құру түрлерін атаңыз
3. Хроматид түріндегі құрылымдық қайта құру түрлерін атаңыз
4. Геномдық мутациялар дегеніміз не
5. Эволюциялық процесте мутацияның рөлі қандай

**Адамның кариотипі**

1 Адамның хромосомаларын визуалды сәйкестендіру принциптері

2 Адам хромосомаларының жіктелуі

3 Хромосома препараттарын дайындау тәртібі

4 Метафаза плиталарын талдау принциптері

5 Адамның хромосомаларын морфометриялық сәйкестендіру

**Хромосомалық аурулар: жыныстық хромосома жүйесіндегі бұзылулар**

1. Жыныстық хромосомалардың саны мен құрылымының бұзылуы
2. Клайнфельтер синдромы
3. Шерешевского-Тернера синдромы
4. Жыныстық хромосомалардың аномалиясындағы өлім
5. Ісік цитогенетикасы

ҚОСЫМША 1

**Ерітінділердің концентрациясы**

Ерітінділердің концентрациясы, әдетте, масса (салмақ) және көлем (сұйықтық үшін) пайызбен, ерітіндінің бірлігінде болатын моль немесе грамм эквиваленттерімен, сондай-ақ титр мен молизммен көрсетіледі. Шамамен алынған ерітінділердің концентрациясы көбінесе массада, мольде, 1 литр ерітіндіде немесе титрде көрсетілген грам эквиваленттерінде көрсетіледі.

Шоғырлануды массалық түрде білдіру кезінде 100 грамм ерітіндідегі (бірақ 100 мл еріткіште) еріген заттың мөлшері (грамммен) көрсетіледі.

Моль түрінде көрсетілген зат ерітіндісінің концентрациясы молярлық деп аталатын 1 литр ерітіндіде болады (бірақ 1 литр еріткіште емес).

1 моль ерітіндіде 1 моль бар ерітінді унимолярлы немесе жай молярлық деп аталады. Заттың мольі (грамм молекуласы) оның молекулалық массасы, грамммен көрсетілген; 0,001 моль миллимол деп аталады.

Егер заттың концентрациясы 1 литр ерітіндідегі грамм эквиваленттерінің санымен өрнектелсе, онда концентрацияның бұл өрнегі нормализм деп аталады. Заттың бір граммына барабар 1 грамнан тұратын ерітінді моно-қалыпты немесе көбінесе жай деп аталады.

Заттың грам-эквиваленті - бұл реакция кезінде біріккен, жылжитын немесе 1,008 г сутекке (яғни, 1 г-атом) барабар болатын грамммен көрсетілген оның мөлшері.

Титр - бұл 1 мл ерітіндідегі грамм құрамындағы зат.

Молярлы ерітінділер дегеніміз - бір заттың бір (немесе бір бөлігін) 1 кг еріткішке еріту арқылы дайындалған ерітінділер.

Қышқылмен сұйылту кезінде суға қышқыл қосыңыз, және керісінше емес!

ҚОСЫМША 2

**ДНК-комет талдау үшін Casp (CASPlab, Вроцлав, Польша) бағдарламасымен жұмыс істеу жөніндегі нұсқаулық**

1. \*.tiff форматындағы қажетті фотосуретті аша отырып, нәтижелерді есептеуді бастаймыз

2. Біз шегендеу шегін жасаймыз. Түсті фотосуретке negat-ға белгі қою керек екенін ескеріңіз. , қара фоны бар фото ( мысал ретінде) - галочки қажет емес

Assay the Comet (бағдарлама панелінде, тінтуірдің оң жақ батырмасымен, Ctrl+A) басамыз

Егер бәрі жақсы болса: Start measurements (панельде немесе Ctrl+M) → Assay the Comet (бағдарлама панелінде, тінтуірдің оң жақ батырмасын, Ctrl+A) → Store Results (бағдарлама панелінде, тінтуірдің оң жақ батырмасын, Ctrl+Z)

3. Кометаларды есептеңіз. Нәтижелер көріну үшін: View → Results window (белгі қою)

4. Нәтижелерді \*.res форматында сақтаймыз: File → Save Results (Ctrl + V) → ашылған терезеде табамыз (жасаймыз) қалтаға → файлды атаймыз → ОК

5. Есептеу аяқталғаннан кейін нәтижелерді мәтіндік құжатқа көшіру (\*.txt): File →Export results (Ctrl+P)→ ашылған терезеде табамыз (жасаймыз) қалтаға→файлды атаймыз→ОК

6. Егер нәтижелер бастапқыда көшірілмесе, бағдарламада қажетті құжатты жүктеу керек \*.res: File → Load Results → қажетті документ → ОК.

Содан кейін 5 қайталау(Сохранение в \*.txt)

7Егер нәтижелерді толықтырғыңыз келсе (мысалы, жаңа фотосуреттен), 6-тармақты қайталаймыз және бұрын ашылған файлды ауыстыра отырып, жаңа есеп беруді бастаймыз.

8. Егер есептеу шеңберін өзгертсе және бағдарлама файлды ауыстыруды талап етсе, оған дейін ашылған файлды іздейміз-бұрын есептелген және жаңасын қоса отырып, оны қайта жазу болады. Нәтижесінде соңғы нәтиже сақталады.