



УДК 636.1.082:575.22

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ АНЕУПОИДИИ У ЛОШАДЕЙ

Добродеева Л.Т., к.с.-х.н.

Институт животноводства НААН

С целью контроля хромосомных нарушений цитогенетическими методами было обследовано 18 кобыл с проблемами воспроизводства. Изучение кариотипа проводили на препаратах метафазных хромосом. Сравнивали эффективность анализа препаратов при использовании различных способов: классической окраске красителем Гимза, дифференциального CBG, GTG окрашивания и техники FISH. Применение FISH метода позволило на препаратах хромосом низкого качества диагностировать у одной лошади анеуплоидию X хромосомы в виде мозаицизма 63,X/64,XX. Остальные животные были с нормальным набором хромосом.

Ключевые слова: цитогенетика, кариотип, хромосома, анеуплоидия, метафаза, мозаицизм.

Цитогенетические исследования в последние годы играют важную роль при оценке животных в плане их пригодности для выращивания и возможности воспроизводства. Активное развитие и применение методов кариотипирования получило в 70-е годы прошлого столетия. В то время были усовершенствованы методы дифференциального окрашивания хромосом, с помощью которых было найдено множество хромосомных нарушений у сельскохозяйственных животных и их потомков - носителей хромосомной патологии. Выявленные хромосомные нарушения чаще всего оказывали отрицательное влияние на развитие половых органов и функцию размножения.

Ключевую роль в цитогенетической диагностике играет выбор методов исследования и объектов микрокопирования. Методы, которые используют в цитогенетике, можно условно разделить на классические и молекулярные. Методы классической цитогенетики заключаются в рутинной и дифференциальной окраске метафазных хромосом. С их помощью возможно провести определение общего числа хромосом и анализ общей морфологии, идентифицировать гомологичные пары хромосом, нарушения в их структуре, а также идентифицировать фрагменты хромосом.

В последние годы ценным дополнением классической цитогенетики стала техника FISH (англ. Fluorescence in situ hybridization - FISH). Флуоресцентная гибридизация in situ сделала возможным идентификацию хромосом или их участков с помощью встраивания денатурированных специфических зондов (меченой ДНК-пробы) в денатурированные метафазные хромосомы. ДНК-проба или зонд - это фрагмент или фрагменты нуклеиновых кислот, меченые таким образом, чтобы было возможно проведение их детекции при микрокопировании препаратов после гибридизации in situ. Меченые фрагмент или фрагменты ДНК, используемые для создания зонда, могут быть клонированными последовательностями ДНК, общей геномной ДНК, продуктом полимеразной цепной реакции или олигонуклеотидного синтеза [1]. Проведение гибридизации in situ с применением зонда дает ответный сигнал при возбуждении светом определенной длины волны, который можно наблюдать под микроскопом в виде свечения флуоресцентного красителя, сцепленного с зондом и комплементарным участком хромосомы. С каждым днем техника FISH находит все более широкое применение в цитогенетике для диагности-



ки изменений в кариотипе. Этот метод может быть с успехом применен как для распознавания небольших структурных мутаций, оценки полиморфизма гетерохроматиновых районов хромосом, картирования генов, так и в идентификации отдельных хромосом в соматических и половых клетках.

Преимуществом этой методики является большая специфичность, чувствительность и скорость исследования. Методика FISH позволяет анализировать очень большое количество метафазных пластинок, даже на препаратах не очень хорошего качества, а также в интерфазных ядрах. Эта методика идеально подходит для диагностики мозаицизма, особенно, где один клон клеток составляет небольшой процент. Так для анализа мозаицизма на уровне 3%, требуется проанализировать не менее 100 клеток, а на уровне 1% - 300 клеток [2].

Материалы и методы исследований. Были проведены цитогенетические исследования у 18 кобыл с проблемами воспроизводства. Материалом для исследования служила периферическая кровь, которую брали одноразовым шприцом из яремной вены в количестве 10 мл в гепаринезированные стерильные пробирки. Культивирование лимфоцитов проводили по методике Arakaki i Sparkesa [3].

С целью оценки кариотипа препараты метафазных хромосом были окрашены рутинно раствором красителя Гимза. Анализ препаратов проводили под световым микроскопом с подключенной компьютерной системой для микрофотографирования MultiScan 6.08.

Следующим этапом в изучении хромосом было применение техники CBG [4], благодаря которой возможно идентифицировать половые хромосомы. Эта методика позволяет увидеть окрашенный конститутивный гетерохроматин. В большинстве случаев эти районы локализованы в прицентромерных и прителомерных районах хромосом и насыщены повторяющимися последовательностями ДНК. В отличие от аутосом, у X хромосомы лошади на q плече находится дополнительный гетерохроматиновый блок, а Y хромосома окрашивается практически целиком, т. к. состоит в основном из гетерохроматина.

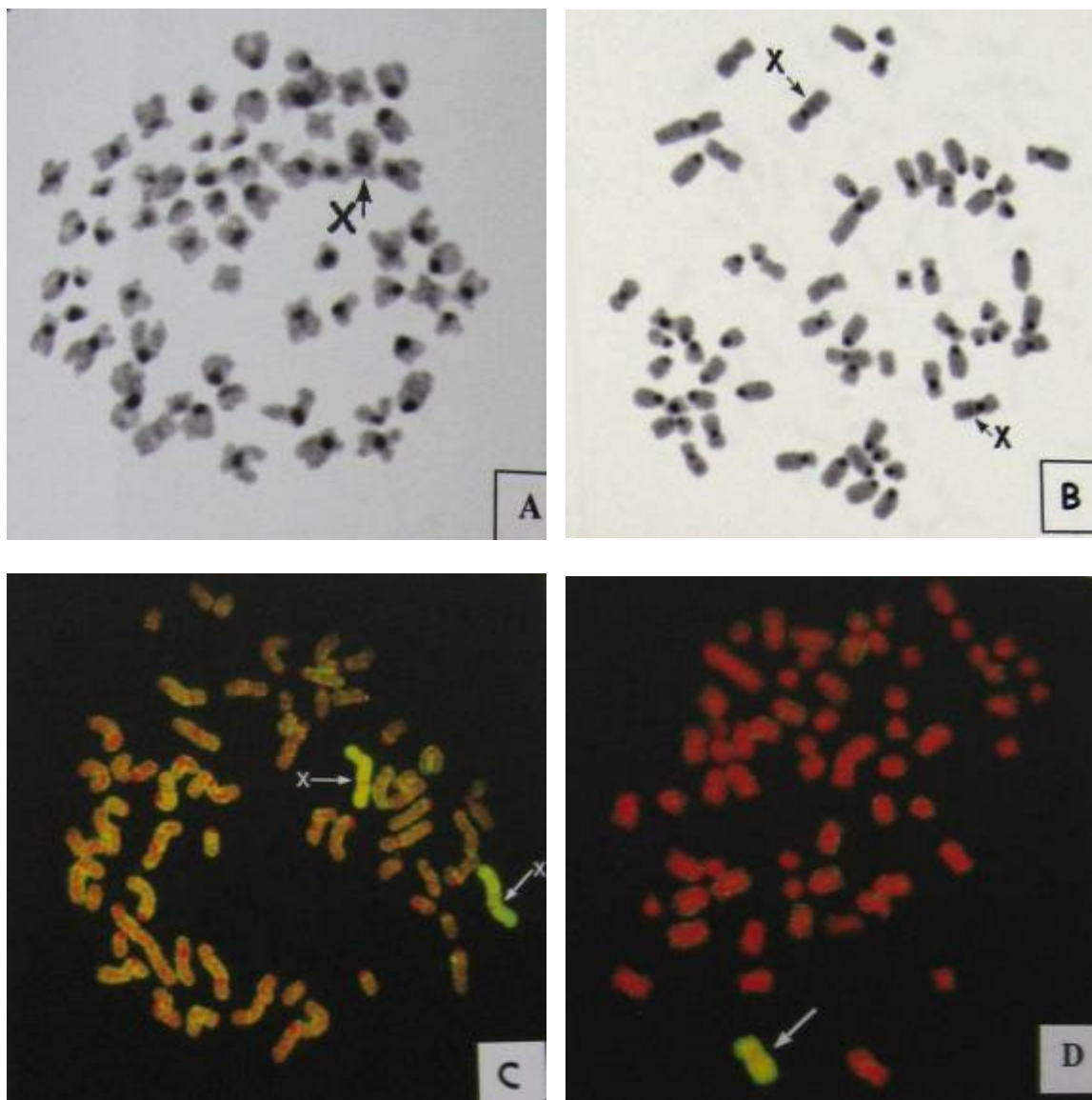
Для идентификации гомологичных пар хромосом использовали технику GTG [5]. Кариограммы, построенные по G-блокам, сравнивали с международным образцом, что позволило с точностью выстроить в ряд по парам отдельные хромосомы, а также идентифицировать предположительные хромосомные нарушения.

Для изучения этих препаратов хромосом, кроме классических методик цитогенетики, были использованы методы молекулярной генетики - флуоресцентной гибридизации *in situ* с зондом, метящим X хромосому лошади. Для проведения этого анализа использовали люминесцентный микроскоп, оснащенный люминесцентной 100 Вт лампой и набором специальных фильтров. Зонд был получен методом микродиссекции, что позволило диагностировать хромосомную aberrацию, а также точно определить частоту встречаемости клона клеток с aberrациями.

Результаты исследований. Из 18 цитогенетически обследованных лошадей у 17 из них был определен кариотип как нормальный 64,XX. Анализ препаратов проводили классическими методами, такими как рутинная окраска красителем Гимза и техниками дифференциального окрашивания: CBG и GTG. Но этих методов исследования оказалось недостаточно в случае анализа препаратов хромосом у одной из лошадей, т. к. было недостаточное количество качественных метафазных пластинок с хорошим разбросом хромосом. Дополнительно была применена техника FISH, которая дала возможность идентифицировать моносомию хромосомы X в форме мозаицизма двух линий 63,X и 64,XX (рис.). Проанализировано



89 клеток. Количество клеток с нарушением составило 8 процентов. Фенотипических отклонений у лошади отмечено не было, наружные половые органы были развиты нормально, но отсутствовала течка и она была яловой.



**Рис. Метафазные пластинки лошади, носителя мозаицизма 63,X/64,XX:
A, B – окраска CBG, 63,X; C, D – FISH, 64,XX.**

Следует отметить, что идентификация нарушений была возможна только после применения техники FISH, ввиду низкого качества полученных препаратов хромосом.

Обзор цитогенетических исследований у лошадей показал, что наиболее встречающимся дефектом у этого вида животных является аберрация, затрагивающая количество половых хромосом - анеуплоидия по половым хромосомам. Такая аберрация вызывает, прежде всего, нарушения в развитии и строении органов воспроизводства и их функций, что приводит к снижению плодовитости или бесплодию [6, 7, 8]. Среди описанных случаев аберраций кариотипа у лошадей большинство поставленных диагнозов указывает на моносомию хромосомы X (63,X) в чистом виде, либо в виде мозаицизма, т. е. наличия двух клонов клеток



63,X/64,XX [9]. При этом, присутствие минимального патологического клона у фенотипически здоровых индивидуумов может вызывать бесплодие, невынашивание беременности, рождение неполноценного потомства [10]. Следующей, по частоте встречаемости, группой нарушений, приводящей к бесплодию, является изменение структуры и, связанные с этим, нарушения функций гетеросом, что вызывает патологическое состояние, так называемое изменение пола. Особи, носители подобной патологии, имеют фенотип лошади, но бесплодны и их кариотип - 64,XY, что является нормой для жеребца [11, 12, 13]. У лошадей также диагностировались случаи присутствия двух клеточных клонов, отличающихся составом половых хромосом: XX и XY. Это может свидетельствовать о нарушении, к которому приводит беременность разнополой двойней, подобно возникновению фри-мартинизма у крупного рогатого скота. Во время беременности двойней наблюдается образование анастомозов между сосудистыми системами обоих плодов плаценты, имеющих общую хориальную оболочку. Результатом этих соединений является наличие клеточного химеризма в крови у особей из разнополых двоен. В будущем у животных, носителей подобного нарушения, это может отрицательно сказываться на их плодовитости [14].

Основными классическими цитогенетическими методами, применяемыми для анализа кариотипа лошадей, являются: рутинная окраска красителем Гимза, позволяющая определять количество и структуру хромосом и дифференциальная окраска С - блоков, при помощи которой идентифицируют конститутивный гетерохроматин в прицентромерных районах всех хромосом за исключением 11-й пары. Дополнительный блок С на q плече является характерным для половых хромосом X, зато хромосома Y окрашивается практически целиком, т. к. она содержит большое количество гетерохроматина.

Исследования с помощью рутинного метода, окраски С-блоков в достаточной степени обеспечивают идентификацию анеуплоидии и явления лимфоцитарного мозаицизма типа XX/XY. Этих методов вполне достаточно для идентификации некоторых структурных aberrаций - таких как Робертсоновская и тандемная транслокации, изменяющие количество хромосом. В случае сбалансированных транслокаций, инверсий (в основном парацентрических), а также делеций и дупликаций, этих методов недостаточно. Частично использование методик окрашивания блоков (С,G,Q) позволяет идентифицировать мутации хромосом. Количество окрашенных блоков (С,G,Q), выявленных на хромосоме, свидетельствует о чувствительности метода. Чем больше блоков можно рассмотреть, тем меньший дефект хромосомы может быть идентифицирован. Следует подчеркнуть, что дифференциальная окраска хромосом также не всегда дает возможность распознать хромосомную aberrацию. Для классических методов окрашивания хромосом существенную роль играет качество хромосомных препаратов, а именно - митотический индекс метафазных хромосом и их расположение на пластинке относительно друг друга. Особенно хорошее качество хромосомных препаратов необходимо в случае подозрения на мозаицизм двух клеточных линий.

Молекулярная цитогенетика начала активно развиваться в 80-е годы прошлого столетия благодаря применению в цитогенетике достижений молекулярной биологии, а именно внедрению метода гибридизации *in situ*. Его разновидностью, относительно часто применяемой в цитогенетике, является флуоресцентная гибридизация *in situ* - FISH. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации метафазных хромосом разработан в Ливерморской Национальной лаборатории США с целью обнаружения в лимфоцитах периферической крови человека стабильных aberrаций хромосомного типа [15]. Этот метод основан на гибридизации специ-



фических повторений ДНК или РНК, помеченных флуорохромом (биотином или дигоксигенином) с комплементарными фрагментами хромосом, зафиксированными на предметном стекле. Применение зондов, меченых различными флуорохромами, флуоресцирующими различными цветами (многоцветовая FISH), дает возможность одновременно идентифицировать несколько различных повторностей ДНК в клетке. Цитогенетический анализ с применением техники FISH состоит в констатации присутствия, оценке величины, количества и локализации флуоресцирующих сигналов определенного зонда в хромосомах. Эта техника находит все большее применение в диагностике изменений кариотипа. FISH метод может быть использован как для распознавания небольших структурных мутаций, оценки полиморфизма гетерохроматиновых районов хромосом, картирования генов, так и для идентификации отдельных хромосом в клетках как в соматических, так и в половых [16].

Применение техники окрашивания отдельных хромосом дает возможность точной детекции геномных и хромосомных мутаций, а также детального представления о перераспределениях различного типа. Кроме того, эта техника может быть использована как для наблюдения явлений полиморфизма, так и консерватизма у разных видов животных.

Техника FISH уже несколько лет активно используется в изучении кариотипа людей, где анеуплоидия половой хромосомы - синдром Тернера (45,X) - составляет около 50 % хромосомных аномалий, диагностированных у новорожденных детей [17]. Возможности обоих методов: классической цитогенетики и техники флуоресцентной гибридизации *in situ* FISH сравнивали Abulhasan и др. [18]. По их данным в 36% случаев диагноз мозаицизма, установленный с помощью одного и другого метода, дал один и тот же результат, однако, в 64 % техника FISH позволила идентифицировать третий клеточный клон. В исследованиях Hansona и др. [19] уровень мозаицизма определялся в 45 % с применением классических цитогенетических методик и в 70% при применении техники FISH.

Назаренко и др. [20] применили метод FISH со специфичным зондом для центромеры хромосомы X человека, идентифицируя эту хромосому, с целью обнаружения, предположительно существующего, второго клона клеток у пациентов с кариотипом 45,X. При этом, предметом исследований были интерфазные ядра лимфоцитов периферической крови. У 29 % пациенток была диагностирована моносомия в форме мозаики двух клеточных клонов.

Метод FISH интенсивно применяют в пренатальных исследованиях. Siffroi и др. [21] используя зонд, метящий целую хромосому, диагностировал у плода человека кариотип 45,X/46,XX, а также очень маленькую кольцевую хромосому X, которая не была идентифицирована классическими методами.

Выводы. Таким образом, проводя цитогенетические исследования у животных, можно с успехом использовать методы дифференциального окрашивания хромосом. Стоимость этих исследований относительно низкая по сравнению с молекулярными методами. Однако у методик дифференциального окрашивания есть свои минусы - они трудоемки и требуют получения препаратов метафазных хромосом очень высокого качества. В свою очередь, техника FISH, несмотря на высокую стоимость, позволяет получать очень точные результаты в короткие сроки, даже в случаях с низким качеством препаратов. Немаловажным обстоятельством является тот факт, что данный метод можно применять как к интерфазным ядрам, так и к половым клеткам.



Библиографический список

1. Рубцов Н.Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих / Н.Б. Рубцов // Новосибирск. – 2006. – С. 54–60.
2. Hook E.B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90% and 95%, and 99% confidence limits and comments on use. / E.B. Hook // Amer. J. Hum. Genet. – 1977. – № 29. – P. 94 — 97.
3. Arkaki D.T. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood / D.T. Arkaki, R.S. Sparkes // Cytogenet. – 1963. – № 2. – P. 57 — 60.
4. Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin / A.T. Sumner // Exp. Cell. Res. – 1972. – № 75. – P. 303 — 306.
5. Wang H.C. Trypsin technique to reveal G– bands. W: Tissue culture methods and applications / H.C. Wang , S. Fedoroff // New York: Academic Press. – 1974. – P. 782 — 787.
6. Chandlay C. Chromosome abnormalities as cause of infertility in mares / C. Chandlay, J. Fletcher, P. D. Rosedale, C.K. Pace [et al.] // J. Reprod. Fert. – 1975. – № 23. – P. 377 — 384.
7. Halnan C.R.E. Sex chromosome mosaicism and infertility in mares / C.R.E. Halnan // Vet. Rec. – 1985. – № 116. – P. 542 — 543.
8. Long S.E. Chromosome anomalies and infertility in the mare / S.E. Long // Equine Vet. J. – 1988. – № 20. – P. 89 — 93.
9. Power M.M. Chromosomes of the horse / M.M. Power // Adv. Vet. Sci. Comp. Med. – 1990. – №34. – P. 131 — 167.
10. Ворсанова С.Г. Молекулярно–цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции/ С.Г. Ворсанова, Л.З. Берешева, Л.З. Казанцева и др.// Пробл. репродукции. – 1998. – №4. – С. 41 — 46.
11. Kent M.G. XY sex–reversal syndrome in the domestic horse / M.G. Kent, R.N. Shoffner, L. Buoen, A.F. Weber // Cytogenet. Cell Genet. – 1986. – № 42. – P. 8 — 18.
12. Power M.M. Equine half sibs with an unbalanced X;15 translocation or trisomy 28 / M.M. Power // Cytogenet. Cell Genet. – 1987. – №45. – 163 — 168.
13. Mäkinen A. Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes / A. Mäkinen, T. Hasengawa, M. Makila, T. Katila // Equine Vet. J. – 1999. – №31. – P. 346 — 349.
14. Bugno M. A case of 64,XX/64,XY leukocytic chimerism in a fertile mare of the Wielkopolska breed / M. Bugno, E. Słota, M. Tischer, A. Kozubska–Sobocinska // Ann. Anim. Sci. – 1999. – № 26. – P. 9 — 16.
15. Edwards A.A. Fluorescence in hybridisation (FISH) / A.A. Edwards // Radiat. Protect. Dosim. – 2000. – 88, №1. – P.5 — 6.
16. Mohaddes S.M. A practical strategy for detection of major chromosome aneuploidies using ratio–mixing fluorescence in situ hybridization / S.M. Mohaddes, E. Boyd, A. Morris, N. Morrison, J.M. Connor // Molec. Cell. Probes – 1996. – № 10. – P. 147 — 154.
17. Perrotin F. Prenatal outcome of sex chromosome anomalies diagnosed during pregnancy: a retrospective study of 47 cases / F. Perrotin, A. Guichet, H. Marret [et al.] // J. Gynaecol. Obstetrics Biol. Rprod. – 2000. – № 29. – P. 668 — 676.
18. Abulhasan S.J. Mosaic Turner syndrome: cytogenetic versus FISH / S.J. Abulhasan., S.M. Tayel, S.A. al–Awadi // Ann. Hum. Genet. – 1999. – № 63. – P. 199 – 206.



19. Hanson L. Genetic analysis of mosaicism in 53 women with Turner syndrome / L. Hanson, I. Bryman, M.L. Barrenas [et al]// Hereditas – 2001. – № 134. – P.153 — 159.

20. Nazarenko S.A. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients/ S.A. Nazarenko, V.A. Timoshevsky, N.N. Sukhanova // Clinical Genet. – 1999. – № 56. – P.59 — 65.

21. Siffroi J.P. Usefulness of fluorescence in situ hybridization for the diagnosis of Turner mosaic fetuses with small ring X chromosome / J.P. Siffroi, O.Dupuy, N. Joy // Fetal Diagn. Ther. – 2000. – № 15. – P. 229 — 233.

ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ АНЕУПЛІДІЇ У КОНЕЙ

Добродєєва Л.Т., Інститут тваринництва НААН

З метою контролю хромосомних порушень цитогенетичними методами було обстежено 18 кобил, які мали проблеми відтворювальної здатності. Дослідження каріотипу проводили на препаратах метафазних хромосом. Порівнювали ефективність аналізу препаратів при застосуванні різних способів: класичну окраску фарбою Гімза, диференційного CBG, GTG фарбування та техніку FISH. Застосування FISH методу дозволило на препаратах хромосом низького татунку у однієї кобили діагностувати анеуплоїдію X хромосоми у вигляді мозаїцизму 63,X/64,XX. Інші тварини мали нормальний каріотип.

Ключові слова: цитогенетика, каріотип, хромосома, анеуплоїдія, метафаза, мозаїцизм.

USING VARIOUS METHODS FOR IDENTIFICATION OF HORSES ANEUPLOIDY

L.T. Dobrodeeva, Institute of Animal Science UAAS

In order to control the chromosome abnormalities and using the cytogenetic methods 18 mares with reproductive problems were examined. Karyotype studying was performed on metaphase chromosome preparations. The preparations analysis effectiveness was compared using different methods, such as: the classic dyeing with Giemsa stain, differential CBG, GTG staining and FISH technique. Application of FISH method led to diagnose X chromosome aneuploidy of one mare in the form of 63, H/64, XX mosaicism with usage of low quality preparations. The rest animals had a normal karyotype.

Keywords: cytogenetics, karyotype, chromosome aneuploidy, metaphase, mosaicism.