

611-018
3-382

А.Ф.ЗАХАРОВ

ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА



А. Ф. ЗАХАРОВ

ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА

(проблемы линейной организации)



МОСКВА · «МЕДИЦИНА» · 1977

ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО К ПЕЧАТИ
НАУЧНО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ СОВЕТОМ ПРЕЗИДИУМА
АМН СССР

Хромосомы человека. А. Ф. ЗАХАРОВ. М., «Медицина», 1977,
192 с., ил.

Книга представляет собой первое обобщение результатов собственных исследований автора и данных литературы по линейной организации хромосом человека. Продольная дифференцированность хромосомы рассматривается в качестве главной особенности, отличающей хромосомную организацию эукариотов. Это положение доказывается путем разбора различных аспектов структурно-функциональной организации хромосомы. Изложены современные данные по дифференциальной конденсации хромосом человека. Показано существование продольной дифференцированности хромосом человека в отношении локализации менделирующих генов и генетически инертного хроматина. Описана репликационная структура хромосом. Представлены данные о гетерогенности ДНК генома человека по повторяемости нуклеотидных последовательностей и составу оснований, а также картирование хромосом человека по локализации специфических фракций ДНК. Приведена обширная информация по дифференциальному окрашиванию хромосом человека. Описана взаимосвязь разных сторон хромосомной организации.

Книга предназначена для биологов и врачей, работающих в области общей и медицинской генетики и цитогенетики.

В книге 49 рис., 2 табл., библиография — 264 названия.

Human Chromosomes. A. F. ZAKHAROV. M., "Meditsina", 1977,
192 p., ill.

The book is the first attempt to review the available data, the author's and from the literature, on linear organization of human chromosomes. Longitudinal differentiation of a chromosome is considered as a main feature of chromosome organization in eucaryotic organisms. This point is evidently discussed along the different aspects of chromosome structure and function. A detailed summary of current knowledge on differential condensation of human chromosomes is presented. Material is presented showing the longitudinal differentiation of human chromosomes with respect to localization of mendelian genes and genetically inert chromatin. Replicative structure of human chromosomes is described. The data are reviewed on human genome DNA heterogeneity with respect to repetitiveness of nucleotide sequences and base composition as well as mapping human chromosomes on specific DNA fractions. A comprehensive information on differential staining of human chromosomes is presented. The relationships between different features of chromosome organization is considered. The book is of interest to biologists and physicians working in the field of general and medical genetics and cytogenetics.

3 $\frac{50400-171}{039(01)-77}$ 51-77

© Издательство «Медицина». Москва. 1977

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последнее десятилетие у нас в стране и за рубежом вышли в свет несколько ценных монографий по цитогенетике человека (под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской, 1969; Hamerton, 1971; Ford, 1973; Dutrillaux, 1975; Schwarzscher, 1976).

Эти монографии носят характер руководств, в которых охвачены все основные проблемы строения и функционирования хромосом человека в норме и патологии. Однако исследования в этой области идут такими темпами и новые сведения нарастают столь стремительно, что в настоящее время возникает необходимость создания монографий по частным проблемам цитогенетики человека, в которых было бы дано исчерпывающее освещение состояния этих проблем, поставлены дискуссионные вопросы. По нашему убеждению, одной из таких проблем, требующей специального обсуждения, становится проблема линейной организации хромосом человека.

В предыдущие годы в области разработки общей модели организации хромосом эукариотов главное внимание было направлено на решение проблемы унитарности или полинементарности строения элементарной хромосомной нити, проблемы одиночности или множественности молекул ДНК, составляющих хромосому как линейную структуру, проблемы укладки молекул ДНК в метафазной хромосоме. В то же время совершенно недостаточное внимание уделялось специфике организации индивидуальных хромосом и их районов. Результаты исследований последних лет позволяют, однако, считать, что основная проблема организации хромосомы у эукариотов — это проблема линейной дифференцированности, проблема специализации участков хромосомы, которая имеет место на разных уровнях, от молекулярного до микроскопического, и в которой взаимодействуют структура и функция. Думается, что создание универсальной модели структурной и функциональной организации хромосом эукариотов должно пройти через этап познания особен-

ностей этой организации у представителей разных видов, а это возможно, если во главу угла ставится задача изучения индивидуальной хромосомы и ее районов.

Хромосомы человека являются одним из наиболее активно изучаемых в настоящее время объектов. Эти исследования имеют важное практическое значение. Вместе с тем трудно переоценить их вклад в познание структуры и функционирования хромосомы вообще. В исследованиях на хромосомах человека особенно остро ставятся вопросы выяснения цитологических и химических особенностей индивидуальных хромосом и их районов, генетического картирования хромосом и роли индивидуальных хромосом и их районов в становлении фенотипа организма. Все эти вопросы особенно интенсивно стали разрабатываться в последние пять лет.

В предлагаемой вниманию читателя монографии сделана попытка обобщить имеющиеся сведения по линейной организации хромосом человека, используя как обширные литературные данные, так и результаты исследований в этой области, которые проводятся в руководимой автором лаборатории общей цитогенетики Института медицинской генетики АМН СССР. В предпринимаемой попытке трудно избежать определенного субъективизма в постановке и интерпретации отдельных вопросов. По-видимому, имеются и прямые упущения в освещении некоторых вопросов. Поэтому я с большой благодарностью встречу критические замечания читателей.

Приношу благодарность за критический просмотр рукописи А. А. Прокофьевой-Бельговской и Н. П. Бочкову. Основной иллюстративный материал представлен сотрудниками лаборатории В. А. Бенюшем, Г. П. Леликовой, Л. И. Барановской, Н. А. Еголиной, Т. Г. Цветковой, Ю. Б. Юровым и Л. В. Потоки, которых искренне благодарю за помощь. Считаю своим приятным долгом выразить признательность зарубежным ученым, приславшим для книги оригинальные микрофотографии — К. Jones and Н. Evans (Шотландия), М. Pardue (Англия), А. Gropp (ФРГ), Р. Gagne (Канада), D. Comings and D. Steffensen (США), G. Corneo (Италия).

Автор

ЛИНЕЙНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТЬ — ПРИНЦИП ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ ЭУКАРИОТОВ

Самым универсальным принципом генетической организации всех живых существ, как бы просто или сложно они ни были устроены, является, пожалуй, линейный порядок расположения единиц наследственности — генов. Само собой разумеющимся кажется в связи с этим утверждение о линейной дифференцированности хромосомы как системы генов, коль скоро любая такая система, кодируя разные признаки, должна состоять из разных генов.

Однако, когда говорится о хромосомах эукариотических организмов, под линейной дифференцированностью хромосомной организации следует понимать нечто иное. При эволюционном переходе от одноклеточных организмов к многоклеточным возникла качественно новая система кодирующих элементов. Хромосомный аппарат эукариотов отличается от такового у прокариотов не просто значительно большим количеством ДНК, организованной более чем в одну хромосому, большими размерами хромосомы, более сложным молекулярным ее строением, обособлением клеточного ядра, развитием специализированного аппарата распределения хромосом при делении клетки и многим другим. Хромосома эукариотов должна отличаться от хромосомы прокариотов не менее разительно, чем отличается одноклеточный организм от многоклеточного фенотипически, поскольку эволюция фенотипа есть выражение эволюции генотипа. И в том, и в другом случае качественный скачок — это скачок от сравнительно простой, крайне зависимой от окружающей среды живой системы к системе интеграции и саморегуляции высокого уровня. «Интеграция достигает своего наивысшего уровня только в многоклеточном организме как целом, однако она всегда сопровождается и

прогрессивной интеграцией молекулярных наследственных структур в хромосомах клеточного ядра» *.

В свете только что сказанного дифференцированность организации хромосом эукариотов по длине — это не первичная расчлененность хромосомы на индивидуальные гены, а более высокий уровень объединения генов в совокупности, способные к относительно автономному функционированию в целостной системе хромосомы и клеточного ядра в целом.

Становится понятным, почему, несмотря на изучение хромосом высших организмов как наследственных цитологических структур с начала этого века, поток исследований не только не ослабевает, но неуклонно нарастает. На настоящем этапе развития цитологической генетики благодаря совместным усилиям генетиков, цитологов и специалистов по молекулярной биологии наука достаточно близко подошла к пониманию организации хромосомы как сложнейшей интегрированной системы единиц наследственности. Проблема линейной дифференцированности хромосомы имеет несколько аспектов.

Важнейшая особенность хромосомы как цитологического образования состоит в том, что это динамическая линейная структура, претерпевающая глубокие преобразования в клеточном цикле, преобразования, которые затрагивают степень конденсации хромосомы и изменяют ее линейные параметры. Замечательно то, что уже по этой функции хромосома является глубоко дифференцированной по длине структурой, способной к одновременной конденсации в одних участках и деконденсации в других. Неодинаковая конденсированность хромосомных участков — хронологически самое первое проявление линейной неоднородности хромосомы, обнаруженное цитологами в начале XX в. в виде хромомерного строения мейотических хромосом. Различие в степени конденсации хромосомных районов наиболее выражено в интерфазном клеточном ядре. Биологический смысл этого явления, его прямое отношение к структуре и функционированию хромосом установил Heitz (1934). Им было показано, что плотно окрашивающиеся районы клеточного ядра представляют собой конденсированные хромосомные сегменты. Такие районы хроматина были названы

* Шмальгаузен И. И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. М., «Наука», 1968, стр. 359—360.

гетерохроматином, а деспирализующиеся после митоза хромосомные участки получили название эухроматина.

Дифференцированность хроматина по степени конденсации в интерфазном ядре влечет за собой разновременность митотической или мейотической конденсации хромосомы в разных ее районах в митозе или мейозе. Хромосома приобретает вид равномерно конденсированной линейной структуры лишь в метафазе. Однако даже на этой стадии современные исследования обнаруживают неравномерность упаковки хроматина, которая соответствует интерфазной подразделенности хромосомы на эухроматин и гетерохроматин (Вагг, Ларсен, 1974).

Этот аспект продольной организации хромосомы, каким бы простым он ни казался по феноменологии, нуждается в серьезной разработке во многих отношениях. От молекулярных механизмов процессов конденсации — деконденсации хроматина до выяснения механических и физических закономерностей укладки хромонемы в конденсированном хроматине интерфазного ядра и в метафазной хромосоме.

Следующим аспектом проблемы линейной дифференцированности хромосомы следует назвать аспект генетический.

Генетические исследования, проведенные в первой половине этого века на душистом горошке, кукурузе, томатах, дрозофиле, нейроспоре, а из млекопитающих — на мыши, привели к открытию двух фундаментальных закономерностей: групп сцепления генов и линейности их расположения. Сопоставление этих данных с цитологическими сведениями об организации и поведении хромосом позволило не только обосновать местонахождение генов в хромосомах, но и составить генетические карты для хромосом указанных видов.

В цитогенетических исследованиях такого рода, выполненных на дрозофиле и других видах, был установлен факт неравномерного распределения менделирующих генов между хромосомами и по длине хромосом (рис. 1). Сейчас известно, что бедные структурными генами участки соответствуют гетерохроматиновым районам хромосом и что молекулярная природа этих двух явлений лежит в специфических особенностях содержащейся в этих районах ДНК.

Однако хромосомы и их участки могут различаться по генетической активности не только в силу различия

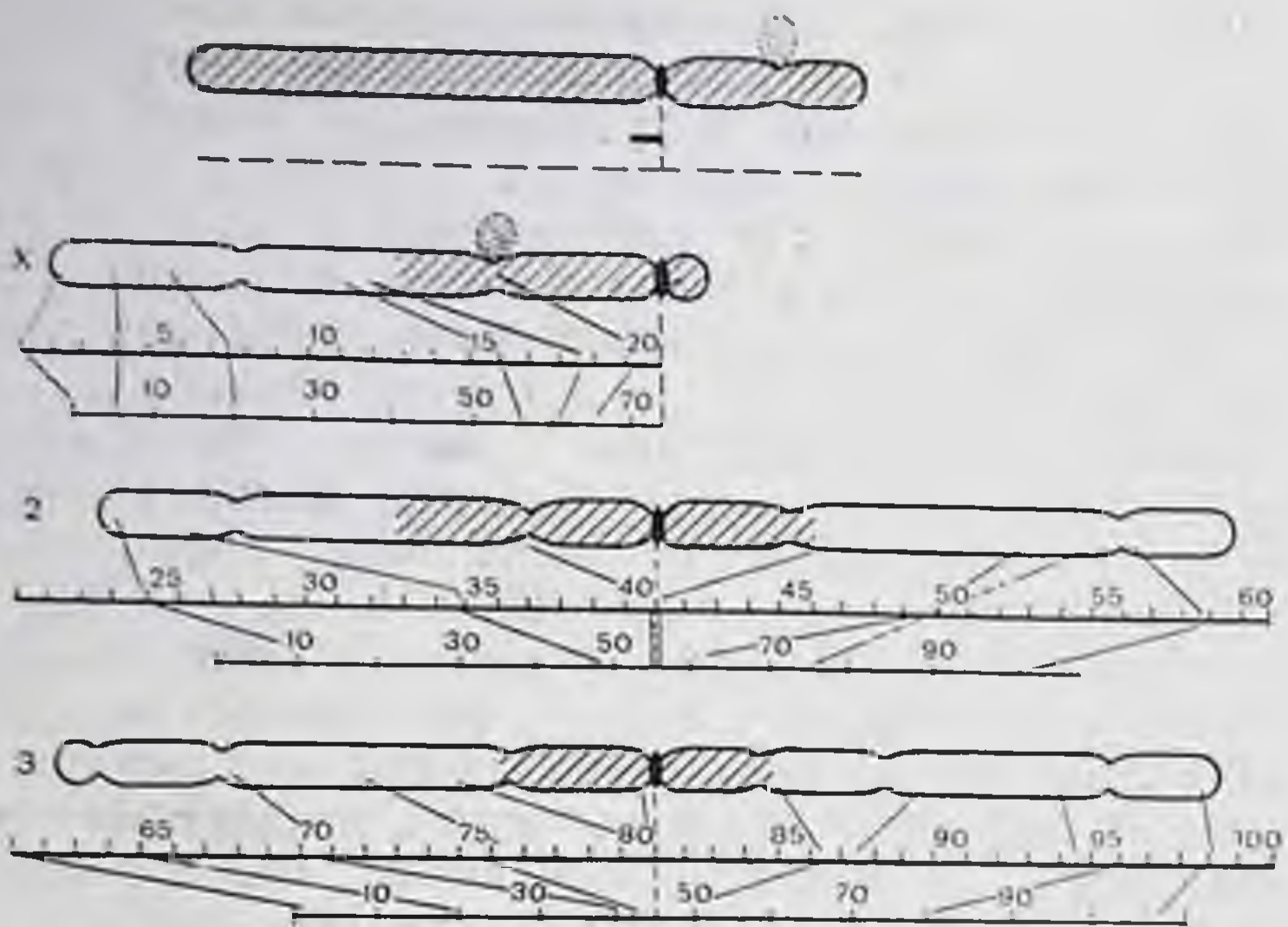


Рис. 1. Сравнительное количество гетерохроматина (заштриховано) и эухроматина в хромосомах дрозофилы (Y, X, 2 и 3) митотических (верхняя схема) и политенных слюнных желез (средняя жирная линия). Нижняя тонкая линия — генетическая карта. Карта политенных хромосом уменьшена до $1/200$ величины по сравнению с картой митотических хромосом. Видны относительно небольшое количество генов в районах гетерохроматина и недоредупликация последнего в политенных хромосомах (Наппах, 1951).

в количестве менделирующих генов, но и вследствие репрессии транскрипционной активности участков, которые в принципе не отличаются от соседних по количеству структурных генов. Цитологические термины для обозначения такого состояния — гетерохроматинизация, факультативный гетерохроматин — подчеркивают, что речь идет именно о состоянии, об обратимости такой инактивации (А. А. Прокофьева-Бельговская, 1945; Brown, 1966). Гетерохроматинизация может захватывать полный гаплоидный набор хромосом, как это имеет место у представителя кокцидий мучнистого червеца. Она является тем механизмом, посредством которого у животных разных систематических категорий, в частности у млекопитающих, устраняется генетическая неравноценность мужского и женского организмов, обусловленная различием в количестве X-хромосом (Lyop, 1972, 1974).

Однако генетическая инактивация может, по-видимому, избирательно захватывать любые отдельные районы

по длине хромосомы, создавая ее линейную дифференцированность по спектру работающих структурных генов. Современные представления о генетических основах индивидуального развития и клеточной дифференцировки исходят именно из этого положения об избирательном включении в активность лишь определенных генов для каждого типа специализированных клеток, для каждой стадии онтогенеза. Цитогенетические доказательства справедливости этого положения получены на политепных хромосомах, когда удается провести параллелизм между деконденсацией хромомера (пуфинг), появлением специфического белкового продукта и морфогенезом (И. И. Кикнадзе, 1972; Edström, 1974, и др.). Для подавляющего большинства биологических видов, не имеющих политепных хромосом, прямых цитогенетических наблюдений избирательной активации или репрессии генов пока не сделано. Доказательства являются косвенными, они основаны на цитогенетическом и радиоавтографическом* обнаружении интеркалярных районов по длине хромосом, отвечающих ряду характеристик гетерохроматина. Гипотеза о дифференциальной гетерохроматинизации отдельных районов хромосом как механизме выключения из генетического функционирования отдельных генов или их групп была сформулирована А. А. Прокофьевой-Бельговской (1945, 1960). Одна из задач изучения линейной организации хромосомы заключается в составлении формальных генетических карт хромосом для того или иного биологического вида, что само по себе является весьма сложным делом, а в перспективе и в выяснении расположения функционирующих и инактивированных генов.

Способность к ауторепродукции — одна из двух главных функций хромосомы как у прокариотов, так и у эукариотов. На настоящем этапе наши знания о репродукции хромосомы ограничиваются сведениями о репродукции ДНК. Время, место и механизм репродукции других компонентов хромосомы, белков и РНК, особенно пространственная связь синтезов этих макромолекул с хромосомой как структурой, остаются недостаточно выясненными.

* Этот термин и по смыслу, и по словообразованию правильнее термина «автордиография», поскольку обозначает автографию биологического материала, содержащего радиоактивную метку.

У прокариотов, хромосома которых представляет собой кольцевую молекулу ДНК, закономерности репродукции хромосомы исчерпываются молекулярным уровнем репликации ДНК. В вирусной или бактериальной хромосоме репликация ДНК начинается в одной точке, строго последовательно и непрерывно проходя в двух направлениях по длине всей молекулы. Следовательно, пространственная и временная единица репликации — репликон — у этих организмов совпадает со структурной единицей организации генома — хромосомой.

Хромосома эукариотов, как уже говорилось, является качественно иной формой структурной и функциональной организации генетического материала, выработавшейся в процессе эволюции параллельно с формированием новых типов живых организмов. Применительно к функции репликации ДНК это усложнение состояло главным образом в возникновении надмолекулярного и цитологического уровней репликационной организации. Хромосомы эукариотов представляют собой полирепликонные системы. Этот принципиальный скачок в репликационной организации хромосомы при переходе от одноклеточных к многоклеточным организмам повлек за собой не только интеграцию индивидуальных репликонов в единую систему, но и вызвал продольную расчлененность совокупности репликонов на группы, способные функционировать относительно независимо друг от друга во времени и пространстве («Серии репликонов» — по Stubblefield, 1974). Сложный порядок репликации ДНК в хромосомах как во времени, так и в пространстве был обнаружен сразу же, как только были найдены методические возможности исследования этого вопроса на хромосомном уровне путем введения предшественника ДНК — меченого тритием тимидина — с радиоавтографической регистрацией мест его включения в хромосоме. Асинхронность синтеза ДНК по длине хромосом, а также межхромосомные различия в его начале и окончании были обнаружены в первых же работах, выполненных на животных объектах, в частности на человеке (Lima-de-Faria *et al.*, 1961).

Многочисленные радиоавтографические исследования последующего десятилетия, проведенные на десятках видов млекопитающих и других животных и растительных организмах, подтвердили принципиальные наблюдения первых исследователей, конкретизировав их для каждо-

го исследованного биологического вида. Принципиальный вывод состоит в том, что хромосома высших организмов представляет собой такую структуру, которая в отношении ауторепродукции дифференцирована на районы, относительно автономные по времени репликации ДНК. Линейная дифференцированность по времени репродукции является характерной чертой хромосом всех эукариотов. В хромосомном наборе того или иного вида каждая хромосома характеризуется индивидуальной картиной такой дифференцированности.

Ясность этих принципиальных положений не означает того, что репликационный аспект проблемы линейной организации хромосомы не нуждается в дальнейшем изучении. Скорее наоборот, поскольку установленные закономерности рождают новые, более сложные вопросы. Среди них такие, как получение точных сведений о последовательности репликации ДНК для индивидуальных хромосом, выяснение на их основе общих принципов репликационной дифференцированности, выяснение механизмов контроля строгой упорядоченности репликации в индивидуальных хромосомах и в геноме в целом. За всеми этими вопросами скрывается главный: связь дифференцированности репликационной организации с остальными сторонами хромосомной организации, особенно генетической.

Молекулярно-генетические представления, сложившиеся на протяжении последних 20 лет в отношении организации и функционирования хромосом, позволяют утверждать, что индивидуальность гена, равно как и все разнообразие генов, определяются особенностями химической структуры ДНК хромосом. Очевидно также, что на молекулярном уровне реализация способности гена к транскрипции определяется взаимодействием кодирующих триплетов ДНК с рядом других биологически активных молекул и прежде всего со структурными и ферментными белками. В этом отношении утверждение о том, что хромосома, как бы ни была она просто или сложно устроена, является дифференцированной химически по длине структурой, кажется само собой разумеющимся. Существует, однако, химическая неоднородность хромосомы в разных ее участках на клеточном уровне.

В первой половине 60-х годов положение об уникальности нуклеотидных последовательностей как основе генетической организации хромосомы вошло в противоре-

чие с обнаружением в ДНК высших организмов многократно повторяющихся идентичных или весьма сходных нуклеотидных последовательностей. К настоящему времени ДНК с такими последовательностями обнаружена в 20% — 80% ДНК генома у всех исследованных высших организмов. О наличии в геноме повторяющихся последовательностей нуклеотидов и об их гетерогенности судят по способности предварительно денатурированной ДНК к ренатурации. По этому показателю ДНК генома эукариотов подразделена, достаточно условно, на три класса: 1) быстро ренатурирующая ДНК, или ДНК с большой частотой повторяющихся копий; 2) ДНК, ренатурирующая с промежуточной скоростью, т. е. обладающая умеренным количеством сходных последовательностей; 3) медленно ренатурирующая ДНК, т. е. ДНК с мало повторяющимися или уникальными последовательностями.

Гетерогенность ДНК генома эукариотов определяется, следовательно, наличием ее семейств, которые различаются между собой количеством копий. Число последних в семействах варьирует от десятков до миллионов. Конкретные нуклеотидные последовательности разных семейств отличаются друг от друга и составом азотистых оснований в сторону преобладания пар А—Т или Г—Ц.

Обнаружение повторяющихся ДНК именно у эукариотов, причем на всех ступенях филогенетического развития, позволяет предполагать, что они играют исключительную роль в структурной организации и функционировании хромосом высших организмов (Г. П. Георгиев, 1973; Britten, Kohne, 1968; Bostock, 1971; Flamm, 1972). Для определенных классов ДНК с повторяющимися последовательностями установлена точная функция. Это те гены, которые обеспечивают продукцию больших количеств специальных видов РНК — транспортных и рибосомной — и должны содержаться в многочисленных копиях. Однако значение большей части повторяющихся последовательностей, особенно тех, что формируют так называемые сателлитные ДНК, остается неясным, и в выработке соответствующих представлений сегодняшнего дня особое место занимают сведения о локализации такой ДНК в хромосомах.

Такое изучение началось с 70-х годов, однако уже сейчас очевидно, что повторяющаяся ДНК наряду с ее более или менее равномерным распределением в геноме в

сочетании со структурными генами (Wopner e. a., 1974; Davidson e. a., 1974) локализуется в хромосомах самостоятельными блоками разной величины. Исключительную роль в обнаружении неравномерного распределения в хромосоме ДНК с повторяющимися последовательностями играет метод гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, на хромосомных препаратах. Проведение таких исследований на хромосомах ряда видов обнаружило во многих случаях локализацию фракций высоко повторяющихся последовательностей крупными блоками, легко выявляемыми даже в метафазных хромосомах. Это прямо указывает на особое функциональное значение неравномерного распределения повторяющейся ДНК по длине хромосом (Rae, 1972).

В чем смысл такого распределения? Как оно коррелирует с продольной дифференцированностью хромосомы по генетической и репродукционной активностям, по состоянию конденсации в интерфазном ядре? Чтобы ответить на поставленные вопросы на современном этапе, необходимы дальнейшие исследования ДНК, а также белков. Мало или почти ничего неизвестно, в какой мере существует на микроскопическом уровне неравномерное распределение других макромолекул хромосомы, в особенности ее белков. Однако тесное взаимодействие ДНК и белков в определении именно надмолекулярной структуры хромосом позволяет предполагать, что на микроскопическом уровне может существовать линейная неоднородность хромосомы и по белковому компоненту. Для изучения этого вопроса, столь же сложного, сколь и важного, цитогенетика только ищет методические подходы (Johnson e. a., 1974).

В конце 60-х годов появились сообщения о том, что метафазные хромосомы растений и животных при соблюдении некоторых условий подготовки препаратов к окраске могут воспринимать краситель избирательно по своей длине. Первые сведения о дифференцированном окрашивании были получены на хромосомах конских бобов, китайского хомячка и человека при окраске акрихин-ипритом. Затем последовали сообщения о возможности избирательного окрашивания участков хромосом красителем Гимзы (А. Ф. Захаров, 1973; Dutrillaux, Lejeune, 1975; Dutrillaux, 1975; Schwarzscher, 1976).

С 1971 г. феномен избирательной окрашиваемости хромосом находится в центре внимания многочисленных ци-

тогенетических лабораторий мира. Такой интерес не случаен. Дифференциальная окрашиваемость хромосом в метафазе митоза оказалась явлением универсальным для хромосом эукариотов. Далее, этот феномен присущ хромосомам на всех стадиях их преобразований в клеточном цикле, а не только в метафазе. В хромосомах профазы митоза способность к избирательности окраски сохраняется, наблюдается лишь усложнение рисунка окрашивания, так как по мере удлинения хромосомы происходит субсегментация районов, которые выглядели в метафазе гомогенными. Гетерохроматиновые районы, активно окрашивающиеся в митотических хромосомах, остаются способными к окрашиванию и в интерфазном ядре. Хромосомы из G_1 -периода клеточного цикла, стимулированные к конденсации путем слияния клеток из G_1 периода с клетками в метафазе, окрашиваются по длине дифференциально. В мейозе хромосома также не изменяет своего отношения к окраске, как это следует из многочисленных работ по G-окраске хромосом в профазе I-го деления мейоза и в метафазе I и II. Не менее важная черта феномена состоит в индивидуальности рисунка окрашиваемости для каждой хромосомы, вследствие чего становятся различимыми элементы набора, одинаковые по величине и форме. Благодаря обнаружению способности хромосомы к неравномерному окрашиванию по длине цитогенетика получила самое простое средство выявления специфической для каждой хромосомы линейной неоднородности в метафазе, т. е. в той стадии ее существования, когда хромосома лишается на время большей части функциональной активности.

Указанные характеристики дают основание считать, что явление дифференциальной окрашиваемости хромосом одновременно отражает как общие всем эукариотам, так и индивидуальные для каждой хромосомы черты организации. Природа явления сейчас усиленно исследуется, поскольку слишком очевидно значение этих исследований для познания фундаментальных законов организации хромосомы.

Изучение любого аспекта организации хромосомы, особенно в их взаимосвязи, осложняется тем, что хромосома не только линейная, но и многомерная структура, способная благодаря конденсации меняться в поперечнике от молекулы ДНП до многократно увеличенного надмолекулярного образования. Налицо проблема латераль-

ной (поперечной) организации хромосомы. По-видимому, имеется несколько уровней поперечной организации хромосомы, и на каждом из них линейная структура испытывает разные преобразования. Даже на молекулярном уровне, когда речь идет о взаимодействии молекулы ДНК и молекул гистонов при формировании элементарной нуклеопротендной нити, эта проблема стала проясняться лишь в последние годы (А. Я. Варшавский, 1976). Проблема значительно усложняется при изучении вопросов укладки молекул ДНП в элементарную хромосомную нить (Solari, 1974). Еще менее ясны закономерности формирования хромосомных структур более высокого уровня конденсации (конденсированный хроматин интерфазного ядра, метафазная хромосома).

Самый сложный вопрос обсуждаемой проблемы — как взаимодействуют между собой элементы продольной и поперечной организацией. В более конкретной форме этот вопрос можно поставить следующим образом: каково соответствие между рисунком линейной дифференцированности хромосомы, обнаруживающимся в метафазной хромосоме, и тем, что скрыты от нас в интерфазной, деконденсированной хромосоме? Это соответствие может быть достаточно полным лишь в том случае, если в процессе формирования метафазной хромосомы исходное линейное расположение участков хромосомы существенно не изменяется. Есть ряд оснований для такого представления (Comings, 1974). Однако соответствие может и не быть или оно весьма относительно, если укладка хромонемы при митотической конденсации строится, помимо поперечных витков (петель), также и на продольных протяженных петлях. Такой способ укладки предусматривается, например, моделью метафазной хромосомы Ю. С. Ченцова и В. Ю. Полякова (1974).

Невыясненность принципиальных вопросов укладки хромонемы при формировании метафазных хромосом заставляет нас придерживаться в этой книге общего термина «конденсация» («деконденсация») применительно к процессам изменения упаковки хромонемы. Этим не умаляется возможная роль регулярной спирализации разного порядка в формировании тела метафазной хромосомы.

Конкретный объект исследования имеет существенное значение в разрешении поставленных вопросов. Изучение продольной организации максимально деспирализо-

ванных функционирующих хромосом крайне ограничено в своих возможностях, так как в интерфазном ядре индивидуальные хромосомы не различимы. Однако у некоторых видов двукрылых существуют гигантские интерфазные хромосомы, которые образуются благодаря многократной редупликации исходных хромосом и сохранению между ними физической связи (гомологичная соматическая конъюгация). Все, что известно о функциональной организации хромосом интерфазного ядра, получено по существу при изучении именно политенных хромосом (И. И. Кикнадзе, 1972). Для подавляющего большинства биологических видов информация об индивидуальных хромосомах может быть получена в тот период жизни клетки, когда хромосомы конденсированы, т. е. в период митотического или мейотического деления. Объем полученных этим путем сведений огромен, на них в значительной мере основаны наши знания об организации хромосом как надмолекулярных цитологических образований.

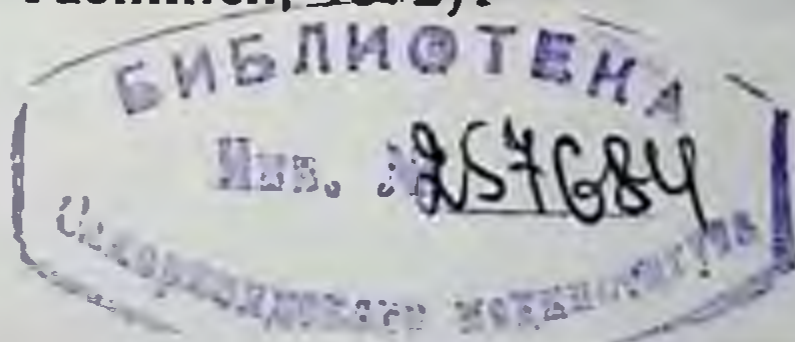
Индивидуальные хромосомы человека, как и других видов млекопитающих, почти не доступны для прямого изучения в интерфазном ядре. Основные сведения по структуре и функционированию хромосом человека получены на хромосомах в метафазе митоза. Это значительно ограничивает наши представления об особенностях функциональной морфологии хромосом человека. Однако и эти сведения в настоящее время настолько обширны, их дальнейшее накопление идет такими темпами, в немалой степени в связи с запросами медицинской цитогенетики, что уже сейчас человек становится одним из наиболее цитогенетически изученных видов среди многоклеточных высокоорганизованных существ.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМОСОМ

ВВЕДЕНИЕ

Дифференциальность конденсации участков хромосомы по ее длине в клеточном цикле соматических клеток или в гематогенезе выражается в трех основных феноменах, обнаруживаемых микроскопически. Во-первых, в сохранении отдельными участками хромосомы (гетерохроматиновыми и гетерохроматинизированными) конденсированного состояния в интерфазном ядре при деконденсации остальной части хромосомного комплекса. Во-вторых, в различной динамике конденсации отдельных участков хромосомы и плеч хромосом в митотическом цикле, что легко обнаружить в профазе митоза и посредством морфометрии хромосом можно уловить в поздней профазе и метафазе. В-третьих, в хромомерном строении хромосом в профазе первого мейотического деления.

Универсальность явления дифференциальной конденсации — деконденсации участков хромосом в интерфазном клеточном ядре сейчас не подвергается сомнению, речь может идти лишь о том, что в различно дифференцированных клетках это явление выражается по-своему. Важно отметить, что конденсированное состояние гетерохроматиновых или гетерохроматинизированных районов в интерфазном ядре не всегда доходит до формирования ими хромоцентров — сравнительно крупных глыбок интенсивно окрашивающегося хроматина. Специальные исследования по этому вопросу привели к заключению, что обычной формой существования гетерохроматинового района хромосомы является конденсированная нить и ее свертывание в плотную глыбку следует рассматривать как крайнее выражение конденсации, как суперконденсацию (Yunis, Yasmineh, 1972).



Изучение интерфазного ядра не дает информации по вопросу о распределении эухроматиновых и гетерохроматиновых районов по длине хромосом. Более того, крайне скудные сведения можно получить о принадлежности глыбок хроматина конкретным хромосомам. У млекопитающих единственное исключение до последних лет составляла гетерохроматинизированная X-хромосома, формирующая глыбку так называемого полового хроматина.

Особым видом интерфазных ядер, при изучении которых имеется исключительная возможность исследовать в дополнение к конденсированному хроматину линейную структуру деконденсированных индивидуальных хромосом в период их интерфазного существования, являются ядра клеток некоторых тканей личинок у нескольких видов двукрылых. Такие ядра содержат политенные хромосомы — совокупности продольно конъюгированных многократно репродуцированных исходных хромосом. Политенные хромосомы, будучи гигантскими по размерам, демонстрируют линейную дифференцированность на большое количество плотных мелких участков — хромомер, которые благодаря политенизации выглядят в виде характерных структур — дисков. Изучение политенных хромосом позволило установить, что хромомеры в хромосоме различаются по величине и взаиморасположению, благодаря чему каждая хромосома приобретает специфический рисунок структурной линейной дифференцированности. Политенные хромосомы, как уникальная модель интерфазных хромосом, обеспечили исследователя возможность прямого изучения морфологии функционирующих генов (И. И. Кикнадзе, 1972; Edström, 1974). Не преминуло последовать принципиальное открытие: хромомерная дифференцированность линейной структуры является основой дифференциальной активности генов, причем в функционирующей хромомере происходит максимальная деспирализация хромосомной нити (пуфинг).

Хромомерная структура рассматривается сейчас как принципиальная в линейной организации хромосом эукариотов вообще.

Структурная неоднородность митотических хромосом принимает разный вид в зависимости от степени конденсированности хромосомы, т. е. от стадии митоза. Первичная хромомерная дифференцированность, развернутая в интерфазном ядре, остается от нас скрытой даже в про-

фазных хромосомах. В этих хромосомах выявляется структурная неоднородность, связанная с неодновременной митотической конденсацией гетерохроматиновых районов, которые находились в интерфазном ядре в конденсированном состоянии, и эухроматиновых районов. В имеющейся литературе, однако, практически нет описаний цитологических карт профазных хромосом, поскольку они длинны, свернуты в клубок и поэтому неразличимы на протяжении всей своей длины. У видов с небольшим числом хромосом в поздней профазе может возникнуть возможность различить индивидуальные хромосомы. В этом случае обнаруживается опережающая («преждевременная») конденсированность гетерохроматиновых районов хромосомы в сравнении с эухроматиновыми и возможно определить локализацию этих районов в хромосоме, как это сделано, например, на хромосомах дрозофилы (Наппах, 1951).

Неравномерность митотической конденсации, существующая в профазе митоза, к середине метафазы, как правило, сглаживается. Метафазная хромосома, являясь наиболее укороченной, одновременно является и наиболее гомогенной по степени продольной упаковки материала. Однако цитогенетика сегодняшнего дня богата описаниями многих проявлений структурной гетерогенности метафазной хромосомы, которые, хотя и в слабой форме, отражают структурную неоднородность интерфазной хромосомы.

Для метафазной хромосомы обязательно наличие первичной перетяжки, которая соответствует положению центромеры. Могут существовать дополнительные перетяжки, известные под названием вторичных. Локализация вторичных перетяжек более или менее определена, но частота и степень выраженности варьирует. Все они могут быть разделены на два вида: связанные с образованием ядрышка и не имеющие к нему отношения.

Вторичные перетяжки, участвующие в образовании ядрышка, являются теми участками хромосомы, в которых расположены гены, связанные с синтезом рибосомной РНК и специфическим морфологическим проявлением функционирования которых служит ядрышко.

Вопрос о природе и значении не связанных с ядрышком вторичных перетяжек окончательно не решен. Как будет видно из изложенного ниже, имеются все основания рассматривать такие вторичные перетяжки как спон-

танно задержавшиеся в митотической конденсации небольшие по протяженности гетерохроматиновые районы хромосом (Hsu e. a., 1964; Schmid, 1967; Zakharov, Egoлина, 1972). Это следует из соответствия вторичных перетяжек районам с поздним временем редупликации, из возможности усиления перетяжек воздействиями, которые задерживают конденсацию гетерохроматиновых районов. У некоторых видов гетерохроматиновые участки достаточно большой протяженности имеют в метафазе много общего со вторичными перетяжками: сестринские хроматиды в них истончены, тесно прилегают друг к другу, слабо окрашены («chromatid apposition»). Такая морфология гетерохроматиновых районов ярче всего выражена в середине метафазы, а к концу ее она становится менее заметной. Наиболее полное описание этого явления на нескольких видах грызунов с подчеркиванием его значения для выявления гетерохроматиновых районов в метафазной хромосоме дал Schmid (1967).

Задержанная конденсация гетерохроматиновых районов, проявляющаяся в форме вторичных перетяжек или растянутых участков большей протяженности, не является правилом для большинства хромосом. Однако имеются ситуации, когда это явление для некоторых районов отдельных хромосом становится регулярным. Такие ситуации могут создаваться в клетках опухолей, спонтанных или перевиваемых, и в клетках, прошедших гетеропloidную трансформацию в культуре.

Дифференциальный характер митотической спирализации в разных районах хромосомы может найти выражение в неодинаковом изменении линейных параметров разных хромосом или их плеч. Это явление подверглось тщательному морфометрическому изучению А. Б. Иорданским с сотрудниками на хромосомах разных видов лука, макаки и человека (А. Б. Иорданский и сотр., 1974). На основании морфометрического анализа длин хромосом и их плеч было установлено, что каждая хромосома имеет свой режим спирализации в митозе. Авторы объясняют это явление индивидуальностью каждой хромосомы по структурно-функциональным особенностям их участков.

В последнее время в некоторых работах по выяснению механизма дифференциальной окрашиваемости хромосом неравномерность конденсации материала по длине хромосомы обнаружена во внешне гомогенных метафаз-

ных хромосомах и, по-видимому, присуща им всегда (см главу VII, с. 175).

Большая группа фактов по дифференцированности хромосомной конденсации в митозе получена при некоторых воздействиях на митотическую конденсацию в эксперименте.

Как впервые было показано на хромосомах лилейных (Darlington, LaCour, 1940), задержку конденсации гетерохроматиновых районов можно получить многочасовым воздействием на делящиеся клетки холодом. В метафазе соответствующие участки хромосом выглядят растянутыми и слабо окрашенными. Эти наблюдения были подтверждены в последующем на ряде растительных видов и на животных. В силу технических неудобств воздействие холодом не стало стандартным методом обнаружения в метафазных хромосомах гетерохроматиновых районов.

Большие перспективы в этом отношении имеет воздействие на хромосомы некоторыми химическими веществами.

Среди химических агентов выделяется 5-бромдезоксипуридин. Его мутагенный эффект и «усиление вторичных перетяжек» были отмечены в ряде работ с использованием животных клеток. Нами было предпринято специальное исследование на хромосомах китайского хомячка с целью отработать условия использования этого агента для индукции дифференциальной конденсации по длине хромосом и изучения на этой основе локализации эухроматиновых и гетерохроматиновых районов (А. Ф. Захаров, 1973 а, б; Zakharov, Egorina, 1972).

Было обнаружено, что возникающее под влиянием 5-бромдезоксипуридина растяжение хромосомных участков является задержкой их конденсации и что такой задержке подвергаются районы хромосом с поздним временем редупликации, т. е. районы структурного и факультативного гетерохроматина. Было сделано заключение о том, что в экспериментально индуцированной дифференциальной конденсации хромосом по длине находит выражение их естественная дифференцированность по времени митотической конденсации, дифференцированность на районы гетеро- и эухроматина.

Имеется еще один цитологический феномен, в котором возможность независимого поведения хромосом или их участков в цикле митотической конденсации находит своеобразное выражение и использование которого внес-

ло свой вклад в изучение локализации в хромосомах гетерохроматиновых районов. Впервые этот феномен был описан Nichols с соавторами (Nichols с. а., 1964), которые наблюдали мелко распыленный хромосомный материал в культивируемых клетках человека под влиянием вируса кори.

В настоящее время сущность и значение феномена раскрыты. Он наблюдается в клетках, содержащих два или более ядер, одно из которых значительно опережает другие в движении к митозу. Не полностью конденсированные и распыленные хромосомы — это хромосомы, находившиеся на той или иной стадии S- или G₂-периода и стимулированные к преждевременной конденсации со стороны клеточного ядра, которое достигает метафазы. Степень конденсации «отстающих» хромосом тем меньше, чем дальше от G₂-периода они находятся в момент вступления в митоз второго ядра клетки. Феномен получил название «преждевременной конденсации хромосом» («prematuration chromosome condensation») и может быть вызван искусственным слиянием с помощью вируса Сендай клеток, одна из которых находится в метафазе (Rao, Johnson, 1973). Этот феномен привлекателен тем, что демонстрирует возможность вступать в митоз хромосомному набору клетки, индивидуальные элементы которого резко различаются по времени прохождения клеточного цикла и, как следствие этого, по степени конденсации. Такое различие может касаться разных участков одной хромосомы, если они обладают естественной асинхронностью конденсации и редупликации, и обеспечить дифференциальную конденсацию участков хромосомы (А. Ф. Захаров, 1973; Stubblefield, 1964).

В мейозе неравномерная конденсация участков хромосомы особенно выражена в профазе первого деления. Основное морфологическое проявление этой неоднородности состоит в хромомерном рисунке хромосом. Хромомерность профазных мейотических хромосом — универсальное явление, свойственное всем видам эукариотов, растительным и животным, со своей спецификой проявления в зависимости от систематического положения вида.

На самых ранних стадиях профазы мейоза, в лептотене и зиготене, хромомеры особенно многочисленны и мелкие, и первичная хромомерная организация индивидуальных хромосом остается неопи­санной из-за переплете-

ния таких хромосом в клубке. С большим или меньшим успехом отдельные хромосомы становятся различимы в пахитене, особенно поздней, в связи с прогрессирующим их укорочением. Однако одновременно, как и в митозе, структурная дифференцированность упрощается и укрупняется. Подробное изучение этого процесса, проведенное на *Agarathus*, показало, что возникающий при этом вторичный хромомерный рисунок остается для данной хромосомы постоянным и специфичным (Lima-de-Faria, 1954). Благодаря этому в пахитене в принципе возможна идентификация индивидуальных хромосом.

Сопоставление структурных карт митотических и мейотических профазных хромосом выявляет их принципиальное сходство, причем в обоих случаях гетерохроматинные районы конденсированы. В последние годы это положение подкрепляется дополнительными тестами на выявление гетерохроматина — различными дифференциальными окрасками (Okada, Comings, 1975, и др.).

ИНТЕРФАЗНЫЕ ХРОМОСОМЫ

В соматических тканях человека не найдено клеток, которые были бы эквивалентом специализированным клеткам двукрылых, содержащих политенные хромосомы. Поэтому полные цитологические картины индивидуальных хромосом в интерфазном ядре остаются неизвестными. Изучение интерфазных ядер принесло, однако, немало сведений о гетерохроматинных районах хромосом. Это направление получило новый стимул к развитию в последние годы в связи с разработкой способов избирательной окраски гетерохроматинных районов в индивидуальных хромосомах.

В настоящее время существуют возможности идентификации в интерфазном ядре гетерохроматинных районов, принадлежащих половым хромосомам X и Y и аутосомам 1, 9, 13—15 и 21—22.

X-хромосома

Выявление гетерохроматинизированной X-хромосомы в интерфазном ядре клеток человека стало рутинной процедурой, широко применяющейся в медицинской практике уже многие годы и известной как выявление полового хроматина (тельца Барра, по новой терминологии).



Рис. 2. X-хроматин в культивируемых фибробластах: а — 46, XX, типичная одиночная глыбка X-хроматина; б — 46, XX, двойное тельце X-хроматина.

гии — X-хроматина, рис. 2). Описанию морфологии и частотам обнаружения X-хроматина в разных клетках человека в зависимости от разных условий, а также генетическим и клинико-диагностическим аспектам проблемы X-хроматина посвящена большая литература. Эти сведения обобщены в нескольких обзорах, специальных монографиях и руководствах по цитогенетике человека (А. Ф. Захаров, 1968; McKusick, 1962; Ohno, 1967; Hamerton, 1971; Ford, 1973, и др.). Коснемся здесь двух вопросов, относящихся к проблеме дифференциальной конденсации X-хромосомы.

Первый из них — полностью или частично конденсирована X-хромосома в интерфазном ядре? Разнообразие морфологии X-тельца хорошо известно. Имеется немало наблюдений о палочковидной форме или двойной структуре тельца Барра, когда две плотные глыбки разделяются менее плотным материалом (рис. 2). Эти наблюдения позволяли предполагать неодинаковую степень конденсации X-хромосомы в разных участках, но не доказывали ее. Более определенные доказательства этому получены при изучении морфологии изо-X-хромосомы по длинному плечу, дицентрических X или других форм структурного объединения двух X-хромосом. В интерфазном ядре такие хромосомы очень часто выглядят в виде двойных образований, нередко пространственно разъединенных. В специальном исследовании по этому вопросу Thegman с сотрудниками (1974) пришли к за-

ключению, что в гетерохроматинизированной X-хромосоме существует центр и градиент конденсации по длине. Привлекая к анализу все описанные в литературе случаи структурных изменений X-хромосомы, они высказывают предположение о локализации центра конденсации (инактивации) в околоцентромерной части длинного плеча X-хромосомы. Представление о неравномерной конденсации X-хромосомы в интерфазном ядре хорошо согласуется с данными о дифференциальной конденсации участков этой хромосомы, которые получены на митотических хромосомах (см. с. 45 этой главы).

Принципиальным является и второй вопрос — каково состояние гетерохроматинизированной X-хромосомы в клетках, где она не обнаруживается в виде конденсированного тельца? Высокая изменчивость частоты телец Барра в интерфазных клетках в зависимости от ткани, пролиферативной активности, клеточной популяции, метаболического состояния и ряда влияний со стороны окружающей клетки среды является хорошо известным фактом. В популяциях культивируемых *in vitro* клеток особенно демонстративна зависимость пребывания X-хромосомы в форме плотной глыбки от пролиферативной активности клеток. Попытки объяснить отсутствие тельца Барра деспирализацией X-хромосомы в период ее репродукции не оправдались, так как в точных экспериментах показано сохранение X-тельца в ядре на протяжении синтетического периода. Не перестает высказываться точка зрения, будто отсутствие тельца Барра означает полную деспирализацию X-хромосомы и функциональную ее активизацию (Bask e. a., 1974). По нашему мнению, такая точка зрения не имеет серьезных оснований, она противоречит всей совокупности генетических, радиоавтографических и клинических данных, неизменно свидетельствующих в пользу незыблемости положения о компенсации дозы генов X-хромосомы у человека и млекопитающих (см. главы III и VII). Наиболее удовлетворительное объяснение дают результаты изучения Yunis с сотрудниками (1972) поведения в интерфазном ядре структурного гетерохроматина половых хромосом пашенной полевки. Полученные авторами данные убеждают в существовании определенного диапазона, в границах которого изменяется степень конденсации гетерохроматина, не доходя до полной деконденсации. На одном конце этого диапазона — сверхконденсированная, хорошо

обнаруживаемая микроскопическая глыбка хроматина, на другом — не всегда определяемое в интерфазном ядре пребывание гетерохроматинового района в форме конденсированной нити. Именно последняя форма рассматривается как типичное состояние гетерохроматина в интерфазном ядре. Нет никаких помех приложению этого представления к факультативному гетерохроматину X-хромосомы.

Анализ числа, частоты, размеров и формы X-хроматина нашел широкое применение в практике цитогенетической диагностики пола человека и численных и структурных изменений в системе X-хромосом. Относящиеся сюда сведения можно найти во всех руководствах по цитогенетике человека (под ред. А. А. Прокофьевой-Бельгоской, 1969; Hamerton, 1971; Ford, 1973).

Y-хромосома

Выявление Y-хромосомы в интерфазном ядре клетки стало возможно сравнительно недавно, что было связано с введением в практику окраски хромосом флуорохромов — акрихина и акрихин-иприта (см. главу VI). Y-хромосома оказалась единственной в кариотипе человека, которая имеет самый крупный сегмент особенно ярко флуоресцирующего хромосомного материала. В большом количестве работ убедительно показано, что флуоресцирующая часть Y-хромосомы соответствует ее гетерохроматину и достоверно определяется в интерфазных ядрах клеток самых различных тканей. Чаще всего используют в этих целях эпителий щеки, белые форменные элементы крови, культивируемые лимфоциты крови и фибробласты кожи, клетки волосяных фолликулов (рис. 3). При сопоставлении одних и тех же клеток, окрашенных акрихином и по Гимзе, выяснилось, что светящемуся тельцу соответствует плотно красящаяся нефлуоресцирующим красителем глыбка хроматина. Однако без флуорохромов Y-хроматин идентифицировать в интерфазном ядре невозможно, поскольку он в отличие от X-хроматина ничем не отличается от мелких глыбок аутосомного гетерохроматина (Wyandt, Hecht, 1972). С другой стороны, специфичность флуоресценции Y-хроматина такова, что позволяет обнаружить его даже в плотно конденсированных клеточных ядрах. Так, Y-хроматин отчетливо обнаруживается в ядрах зрелых сперматозоидов человека

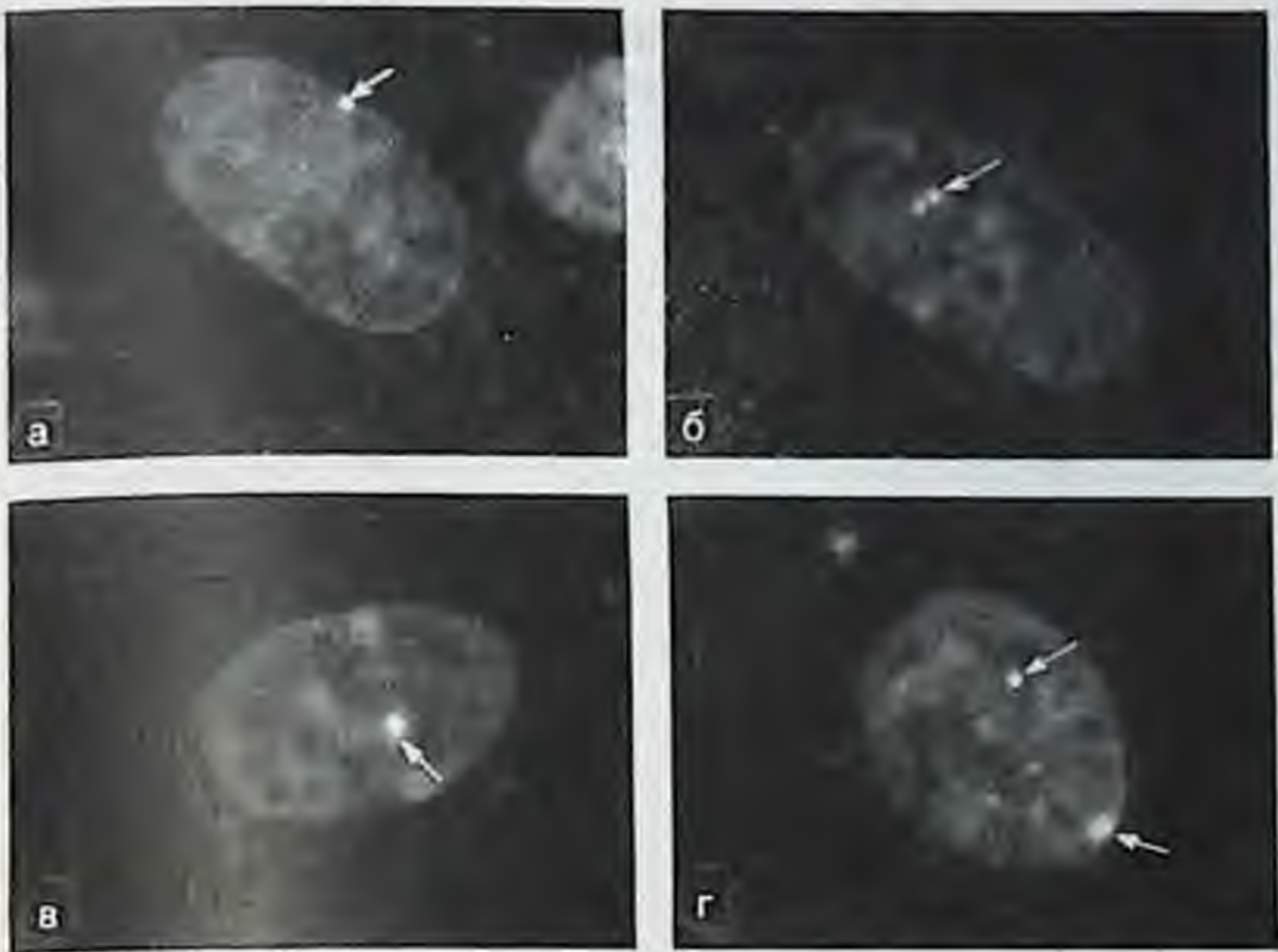


Рис. 3. Y-хроматин в культивируемых фибробластах человека при окраске акрихином (указан стрелкой): а — 46, XY, типичная одиночная глыбка; б — 46, XY, «дубликатное» Y-тельце; в — 46, XY, диффузное Y-тельце; г — 47, XXY, виден Y- и X-хроматин.

(В. А. Бениш, 1973; Barlow, Vosa, 1970, и др.). Морфология и поведение Y-тельца в интерфазном ядре напоминают таковые у X-хроматина. Обычно Y-тельце выглядит компактным точечным образованием, ярко и гомогенно флуоресцирующим (рис. 3, а). Однако при любом анализе определенный процент составляют гетерогенные образования, чаще всего состоящие из двух частей («расщепленные» или «дубликатные» тельца, см. рис. 3, б). Отмечена зависимость процента клеток с таким Y-хроматином от тканевой принадлежности клетки, что в определенной мере может быть связано с пролиферативной активностью ткани.

Wyandt и Necht (1973) нашли широкую вариабельность формы и компактности Y-тельца, от компактного образования до конгломерата из многих мелких частиц. Такой полиморфизм авторы связывают прежде всего с пролиферативной активностью клеточной популяции и периодом митотического цикла, в котором находится

изучаемое клеточное ядро. Большой процент дисперсных телец (см. рис. 3, в) обнаруживается в культивируемых лимфоцитах в противоположность тому, что наблюдается в неделящихся лимфоцитах, а также в логарифмической фазе культуры по сравнению со стационарной. Дисперсный Y-хроматин не обнаруживается в клетках слизистой щек и волосяных фолликулов, которые не размножаются. Дисперсия Y-тельца объясняется авторами его деконденсацией во время репродукции.

Двойная и гетерогенная структура интерфазного Y-хроматина хорошо коррелирует с дифференцированностью этой хромосомы по длине в профазе и метафазе, что обнаруживается разными методами (см. с. 135).

Вариабельность степени конденсации Y-хромосомы в интерфазном ядре делает понятным, почему процент Y-положительных клеток варьирует, по данным разных авторов, от 30 до 75% в зависимости от ткани и у разных индивидов. Как и для X-хроматина, обнаружена низкая частота содержания Y-тельца у новорожденных. Все эти факты говорят, во-первых, о неравномерной конденсированности Y-хромосомы по длине в период интерфазы, во-вторых, о значительной вариабельности плотности конденсации этой хромосомы в целом.

У индивидов с хромосомным набором 47, XXU флуоресцентный анализ обнаруживает оба типа полового хроматина (см. рис. 3, г), причем обычно не имеется трудностей в том, чтобы отличить один от другого: Y-тельце меньше по размерам и активнее флуоресцирует.

В современной медицинской цитогенетической практике флуоресцентный анализ интерфазных клеток стал широко использоваться для цитологической диагностики пола, что имеет особое значение в практике пренатальной диагностики наследственных болезней, сцепленных с полом.

Аутосомы

До введения методов дифференциальной окраски хромосом идентификация в интерфазном клеточном ядре гетерохроматиновых образований индивидуальных аутосом была невозможна.

В соответствии с тем что в метафазе митоза при окраске акрихином ярко флуоресцирующий материал обнаруживается только в немногих аутосомах и мелкими

блоками (3, 4, 13—15, 21—22; см. главу VI), ярко светящиеся глыбки в интерфазном ядре следовало бы расценивать принадлежащими именно этим аутосомам (исключая X- и Y-хроматин). Однако этот вопрос не так прост. В интерфазном ядре, действительно, могут обнаруживаться дополнительно активно флуоресцирующие образования, но их идентификация остается спорной. По наблюдениям Schwinger с соавторами (1974), в интерфазном ядре не проявляются активно флуоресцирующие околоцентромерные районы аутосом 3 и 4. По их мнению, ярко светящиеся образования, связанные обычно с ядрышком, правильнее относить к акроцентрическим хромосомам, но их индивидуализация пока невозможна.

В интерфазных ядрах культивируемых лимфоцитов после специальной обработки препаратов, рассчитанной на удаление хромосомной ДНК, РНК и основных белков, окраска по Гимзе выявляет в районе ядрышек ядрышкообразующие зоны всех акроцентрических хромосом (Matsui, Sasaki, 1973). Их индивидуализация также остается открытым вопросом.

Идентификация в интерфазном ядре специфического гетерохроматина аутосом пока возможна для хромосом 1 и 9. Два конденсированных блока околоцентромерного гетерохроматина 9-й пары идентифицируются благодаря их способности избирательно окрашиваться красителем Гимзы при pH 11 (вариант С-окраски, см. главу VI) (Gagne, Laberge, 1972; Bobrow e. a., 1972). При такой окраске на фоне неокрашенного ядра видны два красно-розовых тельца гетерохроматина аутосомы 9 (рис. 4). Име-



Рис. 4. Околоцентромерный гетерохроматин аутосомы 9 в интерфазном ядре культивируемого лимфоцита (указан стрелкой). окраска по G 11-технике (оригинал от R. Gagne, 1972).

ется несколько сообщений о возможности различить в интерфазных ядрах при окраске по С-технике блоки околоцентромерного гетерохроматина аутосомы 1, особенно если они необычно крупны (Geraedts, Pearson, 1973; Atkin, Barker, 1974, и др.). Можно полагать, что с разработкой методов избирательной окраски гетерохроматина индивидуальных хромосом, а такая перспектива существует, расширятся возможности и для его выявления в ядрах интерфазных клеток.

ПРОФАЗНЫЕ ХРОМОСОМЫ

Исследования морфологии хромосом человека в профазе митоза немногочисленны, но они подтвердили приложимость к хромосомам человека концепции об опережающей конденсации в митозе гетерохроматиновых районов.

В профазе женских клеток была обнаружена одна «преждевременно» конденсированная X-хромосома, что явилось доказательством участия в образовании тельца Барра не двух, а одной X-хромосомы (Ohno, Makino, 1961). В профазе отмечено также конденсированное состояние Y-хромосомы человека (Ohno, Makino, 1961; Wyandt, Necht, 1973).

Профазные хромосомы применяются для идентификации и уточнения морфологии гетерохроматиновых образований, специфически окрашивающихся в метафазе и интерфазе, например гетерохроматина хромосомы 9 и акроцентрических хромосом (Gagne, Laberge, 1972; Matsui, Sasaki, 1973, и др.).

МЕТАФАЗНЫЕ ХРОМОСОМЫ

Размеры и первичная перетяжка

Общая длина и соотношения длин плеч, определяемые положением первичной перетяжки (центромеры), с самого начала легли в основу идентификации и классификации хромосом человека. Существующие рекомендации были выработаны на Денверском (1960) и Лондонском (1963) международных совещаниях и остаются в силе до сих пор. В соответствии с этими рекомендациями все 22 пары аутосом нумеруются от 1 до 22, половые хромосомы обозначаются буквами X и Y (рис. 5 и 6). При ка-



Рис. 5. Нормальный хромосомный набор женщины, 46, XX. Безошибочная идентификация возможна для аутосом 1, 2, 3 и 16.

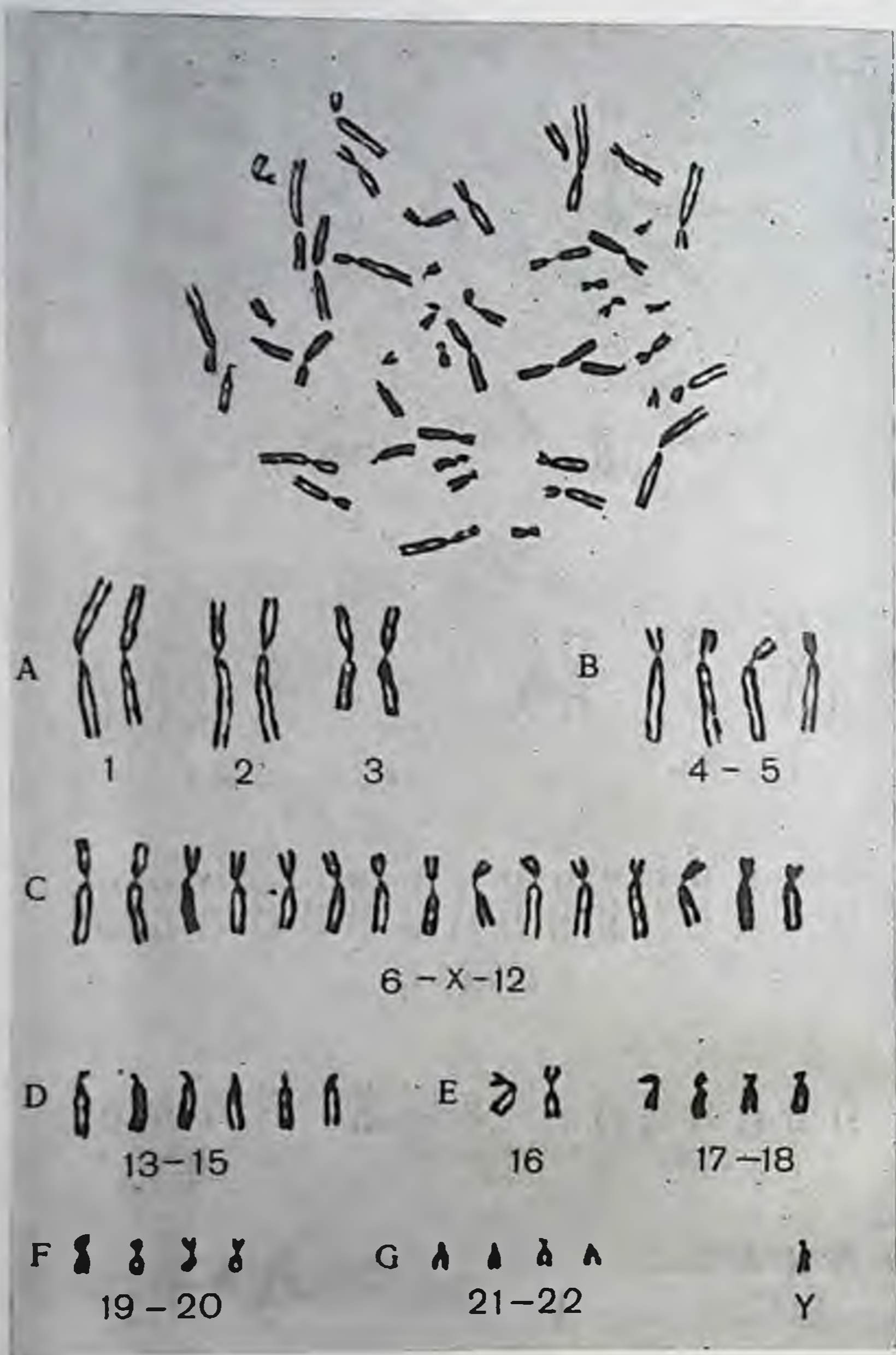


Рис. 6. Нормальный хромосомный набор мужчины, 46, XY. Безошибочная идентификация возможна для хромосом 1, 2, 3, 16 и Y.

риотипировании аутосомы располагают в порядке уменьшения общей длины и центромерного индекса (отношения длины короткого плеча ко всей длине хромосомы в процентах). Следовательно, с нарастанием номера хромосомы уменьшается ее длина в целом и размер короткого плеча. По совокупности этих двух критериев выделяют семь групп аутосом, которым, по предложению Patau, присвоены буквенные обозначения от А до G (Patau, 1960). Группа А (1—3) включает три пары самых длинных хромосом, являющихся метацентрическими и различающихся между собой по одному из признаков. Группа В (4—5) содержит две пары субметацентрических неразличимых хромосом. В группе С (6—12) все хромосомы субметацентричны; первые члены группы отличаются от последних большей длиной и большим центромерным индексом (за исключением хромосомы 11), однако постепенность перехода между ними по обоим критериям исключает бесспорную идентификацию какой-либо пары. Группа D (13—15) включает неразличимые по величине и форме три пары акроцентрических хромосом. В группе E (16—18) хорошо идентифицируется благодаря метацентричности аутосома 16, часто различимы 17 и 18. Группы F (19—20) и G (21—22) содержат очень сходные по размерам, но различные по форме хромосомы: 19—20 — метацентрические, 21—22 — акроцентрические. Внутри групп эти хромосомы не различимы. X-хромосома не отличима от аутосом группы С. Y-хромосома не всегда отличается от G-хромосом по величине и положению центромеры, дополнительным надежным критерием ее идентификации служит тесное прилегание сестринских хроматид длинного плеча друг к другу. В итоге на основании размеров и формы безошибочная идентификация возможна лишь для четырех аутосом (1, 2, 3 и 16) и Y-хромосомы.

Проведенные в 50-х годах морфометрические исследования дали богатый материал по характеристике линейных параметров хромосом. Одна из целей такого анализа состояла в поисках количественных критериев для идентификации хромосом, но не была достигнута. Анализ линейных параметров хромосом, в том числе с использованием графического метода построения поликариограммы, лишь подтвердил невозможность идентифицировать все хромосомы человека только на основании их длин и положения центромеры. Мы не приводим ко-

личественных параметров хромосом человека, так как данные 60-х годов хорошо известны (В. М. Гиндилис, 1967). В основном эти данные получены для групп хромосом, и в настоящее время имеются лишь предварительные результаты измерений индивидуальных хромосом, идентификация которых проведена по окраске (Paris Conference, 1971).

Количественный анализ линейных параметров хромосом неожиданно дал определенную информацию, позволившую увидеть даже в метафазе межхромосомную дифференциальность митотической конденсации и предположить существование таковой в участках одной и той же хромосомы. Межхромосомная асинхронность в скорости укорочения хромосом в метафазе была исследована рядом авторов, причем обнаружено, что более длинные хромосомы сокращаются сильнее, чем более короткие (В. М. Гиндилис, 1966). В этих же работах отмечено, что дифференциальной конденсации подвергаются и плечи одной и той же хромосомы, если они не равны: длинные плечи сокращаются быстрее коротких. Это явление тщательно изучалось А. Б. Иорданским с сотр. (1974), которые использовали хромосомы нескольких растительных и животных видов. Такой анализ был проведен и на хромосомах человека. Были использованы два приема анализа. Уже при первом из них — определении зависимости между абсолютной длиной индивидуальной хромосомы и суммарной длиной набора в целом, когда зависимости имеют линейный характер, на графиках обнаружена характерная «скорость» укорочения для каждой хромосомы или ее плеча. При определении зависимости относительной длины индивидуальной хромосомы или ее плеч от суммарной длины набора индивидуальные графики принимают характер гипербол. Каждое хромосомное плечо характеризуется индивидуальной «скоростью митотической конденсации», не всегда коррелирующей с его длиной. Это обстоятельство дало основание авторам предположить, что первопричиной индивидуальности процесса конденсации является не столько различие в длине плеч, сколько различие в структурно-функциональных особенностях участков по длине хромосом. Строгие морфологические доказательства дифференциальности конденсации участков хромосом получены на метафазных хромосомах в многочисленных работах, к обзору которых мы и переходим.

Спонтанная дифференцированность конденсации

Описание вторичных перетяжек и районов неполной конденсации в нормальных клетках человека, если не считать спутничных перетяжек в акроцентрических хромосомах, начинается с 1961 г., когда появились сообщения об их обнаружении в хромосоме I и одной из хромосом группы C. Первоначальные противоречия в отношении идентификации этих хромосом были вскоре преодолены (Ferguson-Smith *et al.*, 1962; Saksela, Mooghead, 1962; Sasaki, Makino, 1963). Спутничные перетяжки и спутники, отмеченные вначале лишь на отдельных акроцентрических хромосомах групп D и G, вскоре были расценены как потенциально присущие всем 10 акроцентрическим хромосомам. В последующем было отмечено менее регулярное возникновение вторичных перетяжек и на некоторых других хромосомах (В. М. Гиндилис, 1967; Ferguson-Smith *et al.*, 1962). В соответствии с этими данными распределение спонтанных вторичных перетяжек в нормальном хромосомном наборе человека может быть описано следующим образом (рис. 7).

В группе A (1—3) наиболее регулярно обнаруживается перетяжка, нередко имеющая вид недоспирализованного сегмента, в околоцентромерном районе длинного плеча аутосомы 1. Менее определенно можно говорить о перетяжках в длинных плечах аутосом 2 и 3. В хромосомах группы B (4—5) спонтанные перетяжки редки, их локализация на схеме весьма условна. Из хромосом группы C (6—12) наиболее регулярная вторичная перетяжка обнаруживается в трех хромосомах. Одна из них (6) имеет перетяжку в средней части короткого плеча. Две другие (9 и 11) несут перетяжку в околоцентромерном районе длинного плеча. Наиболее часто имеют перетяжку, нередко выглядящую как недоспирализованный район, хромосома 9. В группе D (13—15) перетяжки очень редки, одна из таких хромосом условно отнесена к 13. Перетяжки в коротких плечах, формирующие спутники, являются ядрышкообразующими. Из E-хромосом (16—18) редко встречающиеся перетяжки относят к длинным плечам 16 и 17 пар. В хромосомах групп F (19—20) и G (21—22) спонтанные перетяжки случайны, их отнесение на схеме к хромосомам 19 и 21 также в определенной мере условно. Нередко перетяжка может быть определена в средней части длинного плеча Y-хро-

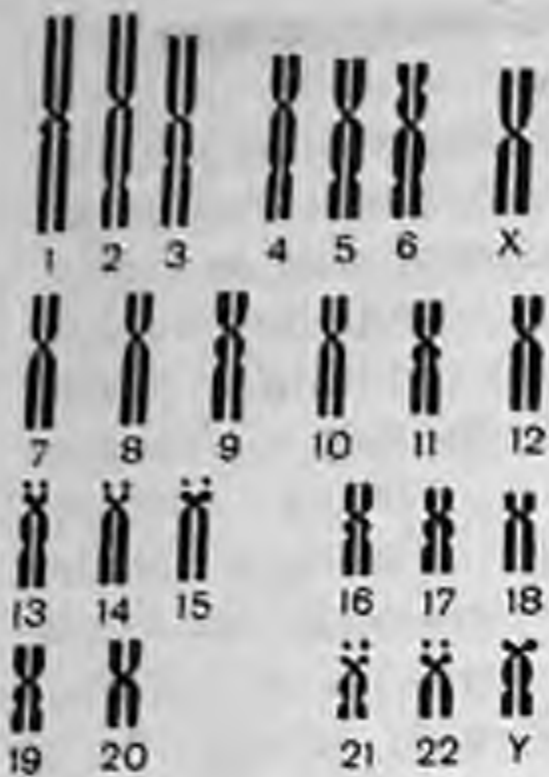


Рис. 7. Наиболее частая локализация вторичных перетяжек в хромосомах человека (Ferguson-Smith e. a., 1962).

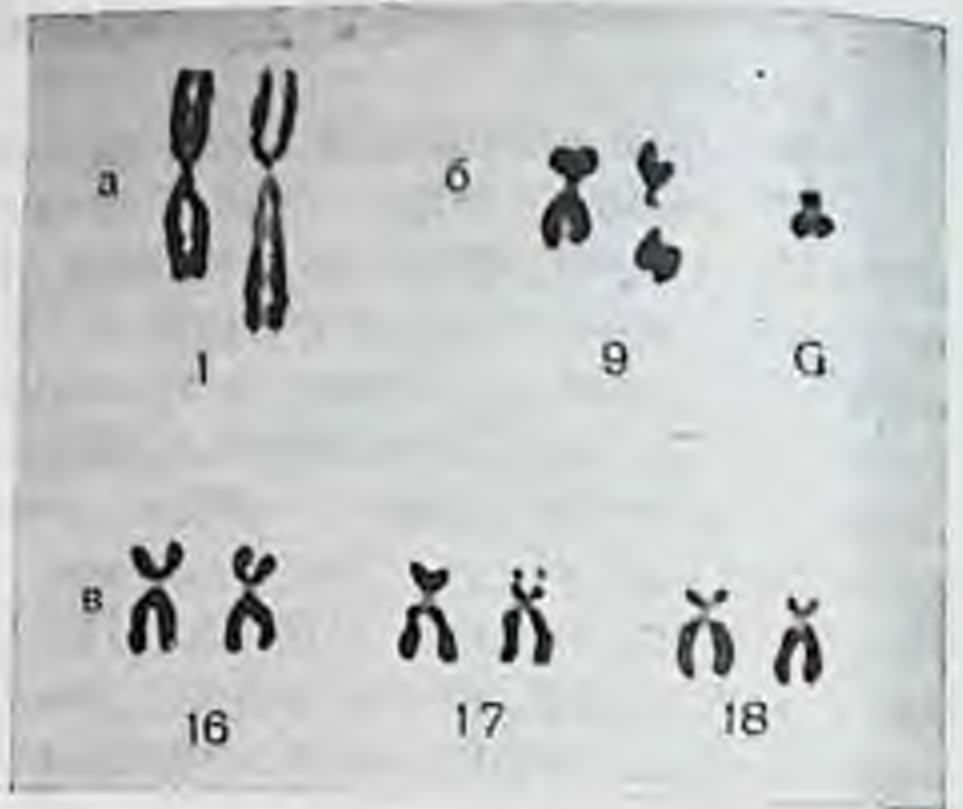


Рис. 8. Спонтанное увеличение районов вторичных перетяжек. а—1qh+; б—9qh+со смещением хромосомных районов (Schwanitz e. a., 1971); в—присутствие «спутника» в коротком плече одной из хромосом 17.

мосомы. Для этой хромосомы характерна еще одна особенность — тесное сближение сестринских хроматид, что отличает ее от акроцентриков сходного размера.

Глубина и протяженность вторичных перетяжек значительно варьируют, что особенно относится к аутосомам 1 и 9. По рекомендации Парижской конференции район вторичной перетяжки или слабо окрашенной зоны обозначается латинской буквой *h*, добавляемой к символу хромосомы и ее плеча. Его увеличение отмечается знаком «+», а уменьшение — знаком «—». Непостоянство вторичных перетяжек и их большой полиморфизм в определенной мере связаны с вариабельностью технических моментов приготовления препаратов, степенью конденсированности хромосомы и другими моментами. Однако по некоторым перетяжкам установлен несомненный индивидуальный полиморфизм, причем вариант перетяжки довольно стабилен для клеток данного индивида и сегрегирует в поколениях семьи как менделирующий маркер. К этому явлению мы еще вернемся в главе VI. Остановимся здесь на случаях необычно сильно выраженных перетяжек.

К настоящему времени описано несколько десятков семей, у членов которых один из гомологов хромосомы 1 имеет необычно крупную растянутую зону околоцентро-

мерной перетяжки длинного плеча (рис. 8, а, Gardner e. a., 1974). Установлено, что нарастание размеров этого района происходит за счет увеличения абсолютно-го количества материала, но также и за счет его неполной конденсации. Вариант наследуется в поколениях. Попытки связать с таким изменением некоторые аномалии развития, обнаруживаемые у отдельных носителей lgh+, не оставлены (Gardner e. a., 1974), однако у большинства индивидов с такой хромосомой фенотип нормален.

Несколько иной характер имеют изменения в околоцентромерном районе длинного плеча аутосомы 2, которые были обнаружены и описаны рядом исследователей (Ferguson-Smith, 1973, и др.). Изменения состоят в том, что в высоком проценте исследуемых клеток в длинном плече рядом с центромерой появляется перетяжка, и нередко в ее зоне наблюдаются хроматидные и изохроматидные пробелы, разрывы и другие структурные изменения. Прямой связи этого изменения хромосомы с фенотипическими отклонениями, которые наблюдались у отдельных индивидов, не доказано.

Во многих работах можно найти описания семей, отдельные члены которых, фенотипически обычно нормальные, являлись носителями аутосомы 9 с необычно длинной зоной околоцентромерного хроматина длинного плеча, нередко подверженной повышенной ломкости (см. рис. 8, б) и имеющей другие признаки гетерохроматинового района (Schwanitz e. a., 1971, и др.). Такие варианты не являются редкими. Среди 282 лиц, не состоящих в родстве, Madan и Bobrow (1974) нашли около 6% индивидов, имевших необычно крупные блоки этого растянутого гетерохроматинового материала, без заметного фенотипического эффекта и наследуемые в поколениях.

В отдельных работах описаны в качестве редких вариантов и другие хромосомы группы С, которые несли стабильные перетяжки в большом проценте соматических клеток.

Еще одна группа подобных работ касается хромосомы 17. В них описывается ряд индивидов, у которых вторичная перетяжка обнаружена в коротком плече одного из гомологов, выражена резко, создавая впечатление присутствия на конце плеча спутника (рис. 8, в). Эта хромосома может передаваться в поколениях, частота ее в соматических клетках разных индивидов различна и

для данного лица может варьировать во времени (Sandstrom, Jenkins, 1973).

Большая часть наследуемых локальных изменений структуры хромосом отражает вариабельность состояния гетерохроматиновых районов. Многие случаи $1qh+$ и $9qh+$ связаны с увеличением количества гетерохроматина в этих районах. Однако некоторые данные говорят и за то, что определенное значение имеет изменение времени конденсации соответствующих хромосомных районов в сторону ее задержки в митотическом цикле. Принципиальная наследуемость таких хромосомных вариантов и в то же время вариабельность проявления варианта в разных клетках одного и того же индивида является свидетельством в пользу этой точки зрения. Обращают внимание наблюдения ряда исследователей о задержке редупликации аномальных районов и даже о «селективной», автономной редупликации несущего этот район фрагмента хромосомы или всего плеча с возникновением частичной трисомии (Lejeune e. a., 1968; Frassago e. a., 1972, и др.).

Избирательное отставание в редупликации и митотической конденсации отдельных хромосомных районов, плеч и целых хромосом может достигать таких степеней, что в метафазе соответствующий хромосомный материал выглядит значительно деконденсированным, фрагментированным и даже распыленным. Такое поведение хромосом в норме исключительно редко (рис. 9), чаще его можно наблюдать на структурно измененных хромосомах, например на кольцевых D-хромосомах (Lejeune e. a., 1968).

Если приведенные изменения свойственны всем или большинству клеток тела и обычно наследуются, то описана еще одна группа изменений морфологии хромосом, когда они свойственны лишь группе клеток или одиночным клеткам. Это прежде всего случаи клеток опухолей *in vivo* или *in vitro*. Среди таких опухолей значатся злокачественные лимфомы опухоли яичка и другие (А. Ф. Захаров, Г. П. Леликова, 1972). Культивирование *in vitro* предрасполагает к усилению стандартных вторичных перетяжек и появлению новых, причем могут наблюдаться хромосомы или их группы с резкой задержкой конденсации, вплоть до распыления хромосомного материала (zur Hausen, 1967). Описана культура псевдодиплоидных клеток, полученная от больного с плоско-



Рис. 9. Спонтанная дифференциальная конденсация нескольких хромосом в метафазе полиплоидной клетки (культура лимфоцитов крови нормальной женщины 46, XX).

клеточным раком, в которой вторичные перетяжки были найдены во всех хромосомах набора в 30 из 58 исследованных метафаз, что позволило попытаться по распределению перетяжек идентифицировать хромосомы человека (Miles, O'Neil, 1966). Для понимания природы описываемых изменений имеет значение то, что отстающие в конденсации хромосомы и их сегменты резко запаздывают в редупликации (zug Hausen, 1967).

Индукцированная дифференцированность конденсации

Накоплено немало фактов относительно способности отдельных районов хромосом человека отставать в конденсации под влиянием внешних факторов: холода, некоторых вирусов и химических веществ.

Работы по индукции дифференциальной конденсации хромосом человека с помощью холода единичны. Первая работа была проведена на культурах клеток легкого эмбриона (Hampe, Levan, 1964).

Авторы наблюдали регулярное возникновение многочисленных вторичных перетяжек во всех хромосомах при различных режимах воздействия холодом, часто сочетавшееся с появлением хромосомных разрывов. Множественность и нечеткость перетяжек не позволили дать цитологических карт их распределения по хромосомам. Наиболее значительные перетяжки наблюдались в районах околоцентромерных блоков гетерохроматина в хромосомах 1 и 9. Появление перетяжек во многих хромосомах культивируемых лимфоцитов при воздействии холодом наблюдал Shigaishi (1972); автор использовал этот прием для идентификации X-хромосом.

Воздействие вирусами, как и холодом, не нашло применения в качестве метода индукции неравномерной конденсации по длине хромосом с целью ее последующего изучения. Однако обширная литература по действию вирусов на хромосомы богата наблюдениями о том, что в клетках — носителях вируса нередко имеет место отставание митотической конденсации отдельных хромосомных районов. К сожалению, этот феномен ни в одной из работ не изучался специально, а описан как явление, нередко сопровождающее возникновение хромосомных aberrаций. Чаще всего на вирус реагируют районы регулярных вторичных перетяжек. Так, описано значительное растяжение околоцентромерных гетерохроматиновых районов аутосом 1, 9 и 16 культивируемых клеток после внесения вирусов простого герпеса (O'Neil, Miles, 1969). Возможно, что спонтанные локальные изменения хромосомной конденсации, встречающиеся в клетках стабильных культур, о которых говорилось выше, на самом деле индуцированы вирусами.

Дифференциальная конденсация хромосом человека под влиянием химических веществ — хорошо изученный феномен, не просто демонстрирующий независимое поведение в цикле митотической конденсации участков хромосомы, но и нашедший применение в описании цитологических карт хромосом по неравномерной конденсации и в идентификации хромосом.

В двух наиболее ранних работах этого направления были испытаны воздействия на фиксированные хромосо-

мы. В одной из них были применены фиксатор, состоящий из метанола и уксусной кислоты в соотношении 1:1, и поджигание фиксатора на предметном стекле при приготовлении препаратов (Saksela, Mooghead, 1962). Этим путем удалось добиться усиления и учащения вторичных перетяжек в аутосомах 1, 9, 16 и Y-хромосоме, а также появления нерегулярных перетяжек в хромосомах групп В, D и С. В другой работе (Sasaki, Makino, 1963) проявление вторичных перетяжек в ряде хромосом было достигнуто культивированием диплоидных фибробластов человека на среде без ионов кальция. Применяв в комбинации оба указанных воздействия, Palmer и Funderburg (1965) также наблюдали учащение появления перетяжек в хромосомах культивируемых лимфоцитов.

В главе I было отмечено, что эффект задержки хромосомной конденсации под влиянием химических веществ обычно наблюдается в качестве дополнительного к повреждающему хромосомы действию мутагенов. На хромосомах человека такие наблюдения сделаны при изучении мутагенного действия стерического аналога цитидина — арабинозилцитидина, антибиотика митомицина и других. Химическим соединением, которое в определенных условиях применения оказалось способным вызывать дифференциальную конденсацию участков хромосом, не индуцируя хромосомных aberrаций, явился галлодозамещенный аналог тимидина 5-бромдезоксиуридин. В первых работах с использованием клеток человека 5-бромдезоксиуридин был испытан как мутаген, но авторы этих работ обратили внимание на его способность значительно учащать и усиливать вторичные перетяжки в аутосомах 1 и 9, реже влияя на другие хромосомы. Специально для идентификации хромосом 5-бромдезоксиуридин был впервые применен в сочетании с культивированием клеток на лишенной кальция среде и фиксацией в смеси метанола с уксусной кислотой в соотношении 1:1 (Palmer, Funderburg, 1965). В этом исследовании авторы вводили в культуру клеток крови 5-бромдезоксиуридин в дозе 75 мкг/мл за 8 ч перед фиксацией. Хромосомный эффект выражался главным образом в усилении спонтанно встречающихся перетяжек (хромосомы 1, 6, 9, 16) или в индукции отдельных перетяжек в новых районах хромосом (4, 5, 6, 7—8, 9, 11, 13).

Разработка методов воздействия этим агентом для индукции дифференциальной конденсации хромосом по

длине, проведенная нами независимо от этих исследований на хромосомах китайского хомячка (см. с. 21 главы I), и полученные при этом результаты убедили нас в том, что воздействие аналогами нуклеозидов может стать принципиальным и перспективным подходом к изучению структурно-функциональной дифференцированности метафазных хромосом человека (Zakharov, Egorina, 1972).

В лаборатории общей цитогенетики Института медицинской генетики АМН СССР были поставлены широкие исследования по этому вопросу, результаты которых оправдали возлагавшиеся на них надежды (А. Ф. Захаров, 1973; А. Ф. Захаров и др., 1973; Л. И. Барановская, В. А. Бениш, 1973; В. С. Демицева, В. А. Бениш, 1973; Zakharov e. a., 1974; А. И. Ибраимов, 1974; В. А. Бениш и др., 1975).

Объектом исследования служили культивируемые *in vitro* лимфоциты периферической крови. Схема применения аналога была единой: его вводили в культуру в концентрации 200 мкг/мл среды на последние 5—7 ч культивирования с добавлением для накопления метафаз колхицина или колцемида на 1½—2 ч. Во всех случаях готовили высушенные препараты.

После прохождения конечных стадий S-периода в присутствии 5-бромдезоксиуридина хромосомы вступали в метафазу неравномерно конденсированными по своей длине (рис. 10). В разных экспериментах процент метафаз с таким эффектом, равно как и его степень, варьируют. Эффект наблюдается в тех метафазах, которые включают аналог в конце S-периода, поэтому удачный выбор времени фиксации клеток нередко решает успех эксперимента. Важно отметить, что в принципе на 5-бромдезоксиуридин реагируют все хромосомы набора; каждая из них, особенно хромосомы среднего и большого размеров, может иметь несколько перетяжек.

Задержанные в конденсации участки хромосомы в большинстве своем очень малы и относятся к разряду вторичных перетяжек. Как видно из рис. 10, большинство хромосом реагирует появлением именно перетяжек, часто нечетко выраженных, так что точное их распознавание и описание затруднено. Другие районы выглядят как более или менее протяженные слабо окрашенные сегменты. Каждая хромосома реагирует по-своему, в результате чего сходные по размерам и форме хромосомы могут



Рис. 10. Дифференциальная конденсация нормальных хромосом женщины (46, XX) под влиянием 5-бромдезоксиуридина. Индивидуальность рисунка конденсации позволяет идентифицировать все хромосомы набора и различать обе X-хромосомы.

быть индивидуализированы по числу, локализации и величине перетяжек. Обобщенные схемы опубликованы (А. Ф. Захаров и др., 1973; Zakharov e. a., 1974). Мы не будем описывать здесь индивидуальных карт хромосом, сделаем лишь основные пояснения по группам их.

Хромосомы 1—3. За исключением околоцентромерного гетерохроматинового района аутосомы 1 и 3, реагирующие растяжением участки этих хромосом очень мелки и перемежаются со столь же малыми районами нормальной конденсированности. Поэтому каждая из аутосом группы А может быть описана как состоящая из большого числа правильно чередующихся сравнительно мелких участков, различающихся по времени конденсации. Это обстоятельство затрудняет получение хорошо сегментированных хромосом группы А.

Хромосомы 4—5. Все четыре хромосомы всегда хорошо сегментированы в коротком плече: в нем регулярно недоспирализуется средняя часть плеча, причем в аутосоме 4 эта зона расположена более проксимально, чем в аутосоме 5. Регулярно и четко дифференцируется длинное плечо аутосомы 4, тогда как в аутосоме 5 длинное плечо реагирует слабо и непостоянно.

Хромосомы 6—12. Если не считать ряда районов отдельных хромосом, достаточно регулярно реагирующих растяжением, все аутосомы этой группы на большей части длины плеч реагируют слабо. Тем не менее в сочетании с общей длиной и положением первичной перетяжки рисунок сегментации в результате воздействия 5-бромдезоксидуридином обеспечивает идентификацию всех аутосом группы С (А. И. Ибраимов, 1974).

Хромосомы 13—15. Три аутосомы этой группы легко идентифицируются в каждой метафазной пластинке. Хромосома 13 выделяется двумя крупными растянутыми сегментами в дистальной половине длинного плеча. В хромосоме 14 регулярно растягивающаяся зона находится в проксимальной части длинного плеча, дистальная его перетяжка выражена слабее. В паре 15 перетяжки очень слабы и нерегулярны.

Хромосомы 16—18. Всегда хорошо сегментирована пара 16, имеющая крупный растянутый сегмент возле центромеры, главным образом в длинном плече, и меньший сегмент в средней части этого плеча. Аутосомы 17 и 18 реагируют менее определенно, поэтому различаются не всегда.

Хромосомы 19—20. Как правило, имеют растянутый центромерный район, одинаково в обеих парах. Различить их удается редко, когда в одной из пар (20) намечается слабая перетяжка в одном из плеч.

Хромосомы 21—22. Эти хромосомы также отчетливо не реагируют на аналог тимидина. Лишь в отдельных пластинках удается увидеть околоцентромерную перетяжку в одной паре акроцентриков (21).

Половые хромосомы X и Y. В женских клетках X-хромосомы всегда идентифицируются благодаря регулярному появлению крупных растянутых сегментов: среднего в коротком плече, проксимального и дистального — в длинном. Наиболее широкой и глубокой зоной задержки конденсации является проксимальный район плеча. Обе X-хромосомы всегда различимы между собой, поскольку в одной из них растянутые участки крупнее, а конденсированные мельче (см. рис. 10). В такой особенно активно сегментированной хромосоме выявляется ряд дополнительных сегментов. В мужских клетках единственная X-хромосома аналогична той из X-хромосом женщин, которая реагирует слабее своего гомолога. Y-хромосома является активно реагирующим элементом набора, растягиваясь в дистальной половине длинного плеча, причем в этом районе имеется субсегментация по степени растяжения.

Проведенное нами детальное сопоставление способности хромосомы и ее участков отстаивать в конденсации в ответ на действие 5-бромдезоксипуридина с хронологией их редупликации ясно указывает на теснейшую связь обеих характеристик (см. с. 74 главы IV). Три основных условия определяют, будет ли хромосомный район задерживаться в конденсации: а) такой район должен включать аналог, б) включение должно происходить на конечных этапах периода синтеза, в) район должен быть достаточно крупным. Всем этим условиям как раз и отвечают те хромосомы, которые неизменно реагируют дифференциальной конденсацией в одном или более участках по своей длине: 1, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 16, X и Y.

Таким образом, наши исследования показали, что метод индукции дифференциальной конденсации в состоянии вскрыть локализацию лишь наиболее крупных и запаздывающих в редупликации гетерохроматиновых районов, что вне его возможностей остается выявление, во-первых, более мелких участков гетерохроматина, хотя

бы и с поздним временем репликации ДНК, во-вторых, участков гетерохроматина, который редуплицируется не в самую последнюю очередь. Как будет видно из дальнейшего изложения, такое представление полностью подтвердилось после того, как хронологию и топографию включения 5-бромдезоксинуридина в хромосомные участки удалось определять не по влиянию на конденсацию, а другими способами (см. с. 89 главы IV).

В наших исследованиях для окраски хромосом применялся азур — эозин, и нельзя было исключить, что при такой окраске часть вторичных перетяжек маскируется. Действительно, Dutrillaux с сотрудниками (1973) в аналогичных условиях воздействия 5-бромдезоксинуридином, но при окраске хромосом акридиновым оранжевым удалось вскрыть более богатую информацией картину продольной дифференцированности всех хромосом набора. По их мнению, методика с применением 5-бромдезоксинуридина превосходит методики Q и G-окрасок по способности выявлять индивидуальную дифференцированность по длине хромосом человека (Dutrillaux, Lejeune, 1975).

Методика выявления линейной дифференцированности хромосом по индукции неравномерной конденсации их участков с помощью 5-бромдезоксинуридина нашла применение в клинической цитогенетике для идентификации перестроенных хромосом. Эта методика оказалась вне конкуренции при диагностике численных и структурных аномалий в системе X-хромосом, так как позволяет безошибочно различать генетически активную и инактивированную X-хромосому (Л. И. Барановская, 1973; Palmer, 1970; Baranovskaya e. a., 1973; Gilgenkrantz e. a., 1975; Laurent e. a., 1975, и др.) (рис. 11).

В возникновении хромосомного эффекта после воздействия 5-бромдезоксинуридином, описанного здесь, существенная роль принадлежит включению аналога в ДНК в период ее репликации. Сходно должен взаимодействовать с хромосомой и 5-бромдезоксипитидин, имеющий тот же эффект на конденсацию хромосомы (Zakharov e. a., 1974). По-видимому, включение атома брома в молекулу ДНК затрудняет последующую конденсацию хромосомного участка через нарушение взаимодействия ДНК с белком. Можно было предполагать поэтому, что вмешательство в митотическую конденсацию хромосомы в принципе достижимо и через воздействие на клетку в G₂-периоде. Оправданность такого пути подтверждается

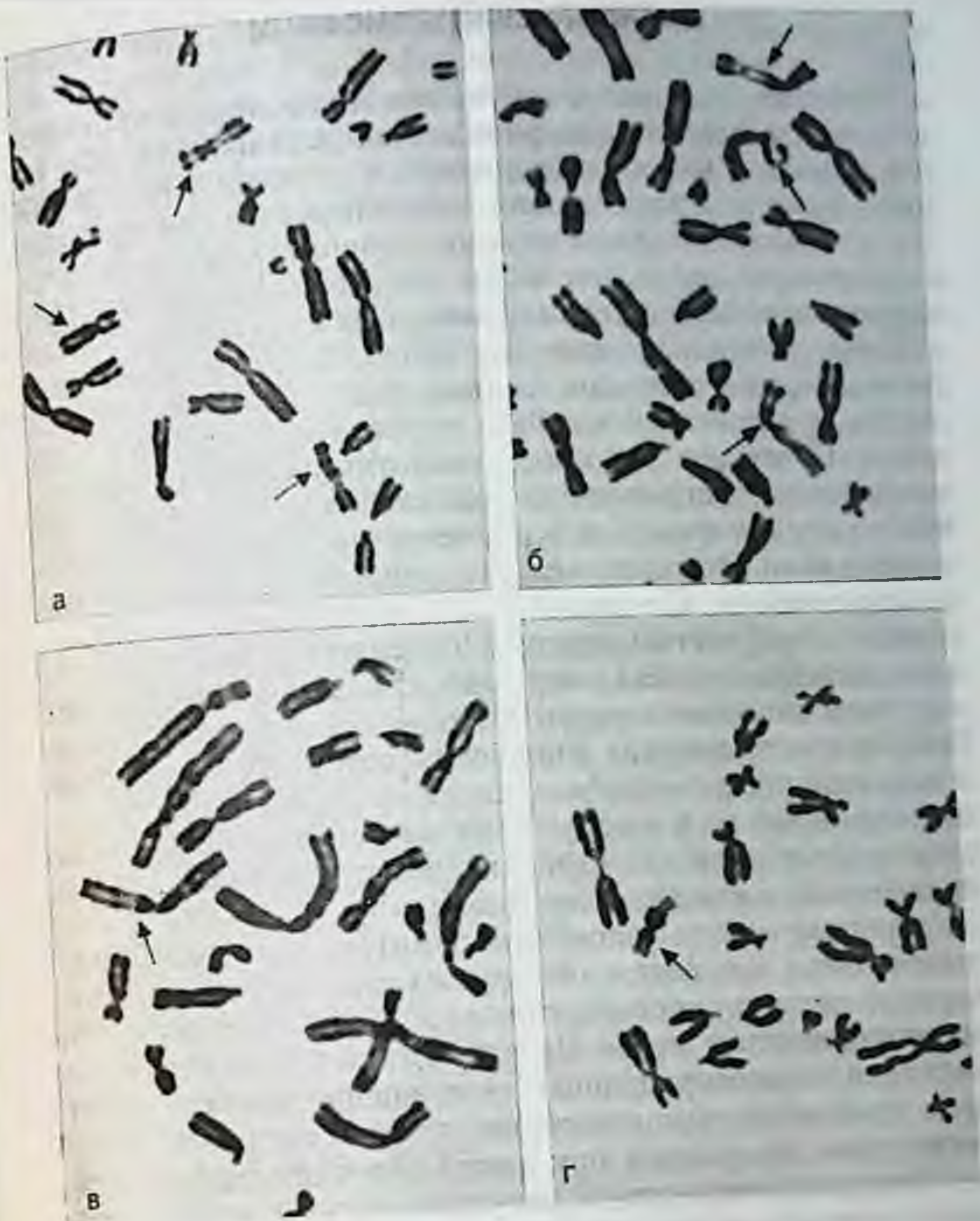


Рис. 11. Идентификация аномалий в системе X-хромосом с помощью 5-бромдезоксипуридина: а — 47, XXX; б — 49, XXXXY; в — 46, X, i(Xq); г — 46, Xdel(Xp—q—). X-хромосомы указаны стрелкой.

результатами нескольких работ, в которых были испытаны другие соединения (актиномицин D, этидиум бромид, ногаламицин и др.), способные интеркалировать в молекулу ДНК и тем самым мешать взаимодействию ДНК с другими белками, участвующими в хромосомной конденсации (Hsu e. a., 1973).

МЕЙОТИЧЕСКИЕ ХРОМОСОМЫ

Попытки подойти к изучению морфологии хромосом человека в мейозе предпринимались уже в 20-е и 30-е годы, однако с весьма ограниченным успехом из-за неразработанности в этот период техники получения препаратов хромосом. Начало новому периоду в исследовании мейотических хромосом было положено успешным применением в 1956 г. техники давленных препаратов к биопсийному материалу мужских гонад, в результате чего были впервые получены точные данные о числе бивалентов у человека в профазе первого мейотического деления. С тех пор работы на мейотических хромосомах человека не прекращаются, однако их число остается весьма ограниченным и в изучение проблемы линейной организации хромосом человека они не внесли принципиально нового. По-прежнему остаются трудности, связанные с получением для приготовления препаратов свежего материала гонад, особенно женских, хотя в последние годы появились работы и по женскому мейозу. Основная методическая сложность состоит в том, что даже в пахитене профазы мейоза, когда хромосомы значительно укорочены, но в то же время не настолько, чтобы утратить хромомерность строения, получить отдельно лежащие биваленты очень трудно.

Анализ хромосом человека в пахитене как в сперматогенезе, так и в оогенезе обнаруживает их значительно переплетенными, состоящими из двух гомологичных конъюгированных нитей. По длине таких бивалентов выявляются темноокрашенные конденсированные участки — хромомеры, число которых уменьшается по мере сокращения хромосомы при движении к поздней пахитене. Анализ хромомерного рисунка затрудняется рыхлостью структуры бивалентов.

Первые работы по пахитенному анализу хромосом выполнены на материале мужских гонад. В них была обнаружена хромомерность пахитенных хромосом, сделаны первые попытки описать хромомерный рисунок девяти аутомных бивалентов и было показано, что в образовании ядрышка принимают участие своими терминальными хромомерами пять бивалентов, являющихся акроцентрическими хромосомами. Идентификация их проведена не была. В некоторых других обстоятельных исследованиях преобразования хромосом в мужском мейозе анализу ин-

длиндуальных хромосом, к сожалению, не уделено большого внимания (А. А. Прокофьева-Бельговская, 1969). Было показано, что X- и Y-хромосомы выделяются своей конденсированностью и поэтому могут быть идентифицированы еще в лептотене; в пахитене они конъюгируют концами и формируют так называемый половой пузырь.

Попытка провести на основе пахитенного анализа идентификацию всех аутомных бивалентов впервые была сделана Eberle (1966). Принимая во внимание длину бивалентов и хромомерный рисунок, автор выделил 22 аутомных бивалента, однако их идентификация была очень условной, ее трудно сопоставить с идентификацией митотических хромосом, и эта работа имеет лишь исторический интерес.

Более строгий подход к идентификации пахитенных хромосом мы находим в работах начала этого десятилетия. В исследовании, выполненном В. К. Борджадзе и А. А. Прокофьевой-Бельговской (1971), для индивидуального анализа была взята группа акроцентрических хромосом, выделение бивалентов которых от остальных аутом было гарантировано их связью с ядрышком. В результате хромомерного анализа 158 бивалентов из группы D и 50 из группы G в обеих группах удалось различить индивидуальные биваленты, которые были условно обозначены D₁, D₂, D₃, G₁, G₂. Биваленты различались между собой длиной, числом хромомер, их размерами и формой, тенденцией к слиянию. Лишь совокупность признаков позволила провести надежную внутригрупповую идентификацию. Серию статей по пахитенному анализу в мужском мейозе опубликовали Hungerford с сотр. (Hungerford, 1972—1973).

Авторы использовали для анализа биваленты в поздней пахитене, подчеркивая трудности выделения индивидуальных хромосом в ранней пахитене. Были построены пахитенные карты для акроцентрических хромосом групп D и G.

На более поздних стадиях профазы первого мейотического деления прогрессирующая конденсация бивалентов, позволяя получать в диплотене — метафазе I раздельно лежащие хромосомы, одновременно сглаживает хромомерность структуры. На этих стадиях идентификация хромосом и анализ их линейной структуры обеспечиваются на основе дифференциальной окраски. Поэтому

в клинко-цитогенетических исследованиях идентификация хромосом проводится на поздних стадиях профазы первого деления (Hulten, 1974).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дифференцированность конденсации хромосом человека по длине как морфологическое выражение продольной структурно-функциональной расчлененности хромосомы выражается: а) в конденсированном состоянии отдельных хромосомных участков в интерфазном ядре при деконденсации остальной части хромосомы, б) в неравномерной конденсации разных участков хромосомы в митотическом цикле, в) в неравномерной конденсации районов хромосомы в профазе первого мейотического деления, что обуславливает хромомерное строение хромосом. Во всех трех случаях неодинаковое поведение в цикле конденсации — деконденсации касается одних и тех же хромосомных участков. Конденсированное состояние в период интерфазы, опережающая конденсация в профазе митоза и формирование хромомер в профазе мейоза присущи гетерохроматиновым районам хромосом, деконденсированность — характерный морфологический признак эухроматина.

Полное выявление распределения по-разному конденсированных районов в индивидуальных хромосомах человека в период интерфазы в настоящее время невозможно. В интерфазном ядре соматических клеток, как правило, выделяется своими размерами, формой и положением гетерохроматинизированная X-хромосома. Благодаря разработке способов избирательной окраски гетерохроматиновых районов индивидуальных хромосом намечается перспектива идентификации в интерфазе таких районов. Пока это возможно для околоцентромерного гетерохроматина аутосом 1 и 9, гетерохроматина Y-хромосомы и отчасти гетерохроматина ядрышкообразующих районов акроцентрических хромосом.

В профазе митоза из-за трудностей в выделении индивидуальных хромосом возможности их идентификации также весьма ограничены. По опережающей конденсации возможна идентификация гетерохроматина X-хромосомы в соматических женских клетках, а в сочетании с избирательной окраской можно обнаружить «преждевременно» конденсированные крупные блоки гетерохро-

матина хромосом 1, 9 и Y. Те же трудности в выделении индивидуальных хромосом в профазе мейоза объясняют ограниченные возможности пахитенного анализа хромосом в целях описания индивидуальности их хромомерного строения и на этой основе идентификации полных хромосом и их районов.

Основная информация по дифференциальной конденсации участков хромосом, позволившая подойти к составлению индивидуальных карт неравномерной конденсации и к идентификации всех хромосом человека, получена при их изучении в метафазе митоза. На этой стадии может наблюдаться спонтанное отставание конденсации гетерохроматиновых районов в сравнении с эухроматиновыми. Разработаны способы экспериментальной индукции задержки конденсации этих районов, в результате получены сведения о том, что все хромосомы человека являются неоднородными по длине в отношении прохождения цикла конденсации и каждая из них характеризуется своим специфическим рисунком такой неоднородности. Крупными районами гетерохроматина в хромосомах человека, которые обнаруживаются таким путем, являются околоцентромерные зоны длинных плеч аутосом 1, 9, 16 и дистальная часть длинного плеча Y-хромосомы. Размеры этих районов у разных индивидов могут различаться. Сравнительно крупные районы интерстициального хроматина, который отстает в конденсации, локализованы в аутосомах 4, 13, 14 и в X-хромосоме, подвергающейся гетерохроматинизации. Подавляющее большинство хромосом дифференцированы по длине на средние и мелкие участки, но их точная локализация и выяснение размеров затруднительны. Потенциальные возможности картирования хромосом по степени конденсации в условиях экспериментального на нее воздействия далеко не исчерпаны.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТЬ ХРОМОСОМ

ВВЕДЕНИЕ

Различия участков хромосомы по генетической (транскрипционной) активности, как уже говорилось выше (см. главу I), определяются двумя главными факторами: содержанием бедного менделирующими генами хроматина (структурного гетерохроматина) и временно инактивированного хроматина, имеющего в своем составе менделирующие гены. Для суждения о генетической активности хромосомы или ее района обычно применяются два методических подхода.

Один из них, классический цитогенетический подход, давший так много при использовании на дрозофиле и мыши, состоит в построении генетических карт хромосом. Как известно, такое картирование складывается из нескольких этапов. Главная процедура картирования — гибринологический анализ, в ходе которого определяется сцепление и процент рекомбинаций изучаемых мутантных генов. Для этого анализа важно иметь набор мутантных генов по возможности в большом количестве. Далее следует собственно построение генетической карты, где мерой расстояния между двумя сцепленными генами служит частота рекомбинаций (перекрестов). Заключительный этап состоит в создании собственно цитогенетической карты данной хромосомы. Невозможность привязать исследуемые мутации к данной хромосоме или ее участку будет свидетельствовать об их бедности соответствующими структурными генами.

Именно таким путем были описаны четыре группы сцепления генов у дрозофилы общим числом около 100, соответственно четырем хромосомам: I (X), II, III и IV. В Y-хромосоме, приближающейся по размерам к X-хромосоме и в несколько раз превосходящей хромосому IV,

были обнаружены лишь гены, определяющие плодовитость самцов и влияющие на размер щетинок — ген *bobbed* (Hannah, 1951). Y-хромосома дрозофилы состоит главным образом из гетерохроматина. Оказалось, что бедность менделирующими генами — характерный признак гетерохромативных районов и других хромосом у дрозофилы. Пересчет, сделанный Hannah (1951), показывает, что на единицу длины гетерохроматина у дрозофилы приходится значительно меньше генов, чем в эухроматине (см. рис. 1).

Исследования групп сцепления генов и их хромосомной локализации на других видах показали широкую распространенность этого явления — существования в тех или иных хромосомах бедных структурными генами районов. Такие районы особенно характерны для половых хромосом, у млекопитающих — для Y- и X-хромосомы (Ohno, 1967). Однако классический метод составления цитогенетических карт, будучи основан на гибридологическом анализе, мало применим к человеку, здесь он заменен методом, в котором используются гибриды соматических клеток.

При втором подходе исследуются неблагоприятные фенотипические последствия изменения баланса той или иной хромосомы или ее района: чем меньше такие последствия, тем больше оснований рассматривать изменяющийся в количестве хромосомный материал как генетически инертный, гетерохроматиновый. Большой фактический материал получен по этому вопросу на различных растениях и животных. При этом выяснилось, что утрата или приобретение материала, богатого гетерохроматином, значительно меньше влияет или совсем не отражается на жизнеспособности и плодовитости организма по сравнению с отклонениями от нормы в количестве эухроматина. Таковы, например, незначительные последствия изменения числа X- и Y-хромосом у дрозофилы, мыши. Не обладает заметным генетическим эффектом изменение в числе добавочных (B) хромосом, часто наблюдаемое у ряда растений и многих насекомых. В разряд этих явлений попадает и диминуция гетерохроматина, наблюдающаяся в раннем онтогенезе у некоторых червей, и явление физиологической редукции гетерохроматиновых районов хромосом дрозофилы при их политенизации. Наконец, широко известно, как сравнительно легко переносит соматическая клетка утрату или приобретение допол-

нительных гетерохроматиновых сегментов при индуцированном мутагенезе или в ходе гетеропloidной опухолевой трансформации.

В цитогенетике человека используются оба подхода.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ХРОМОСОМ

Генетическое картирование хромосом складывается, как мы говорили, из определения: а) сцепления двух или более генов, б) расстояния между ними, в) хромосомной локализации изучаемого гена или группы сцепления.

Поскольку описание генетических карт человека не является задачей книги, ограничимся здесь самыми общими комментариями к работам этого направления, отсылая читателя к обстоятельным обзорам и специальным изданиям (А. Г. Буланов, К. Н. Гринберг, 1973; Ruddle, 1972; Rotterdam Conference, 1974; McKusick, 1975). В настоящее время эта область бурно развивается, и приведенные данные верны лишь по состоянию на конец 1975 г. (рис. 12).

Начиная с 30-х годов, когда была сделана первая попытка анализа сцепления двух генов у человека, классический гибридологический анализ мог быть применен на человеке, по понятным причинам, в весьма ограниченных пределах. Изучение родословных в семьях с наследственными болезнями — единственный способ такого анализа, — несмотря на большое внимание к разработке математических принципов оценки сцепления генов именно в родословных человека к настоящему времени дало немного. Были определены две главные группы сцепления генов, одна из которых отнесена к аутосоме 1 и вторая — к X-хромосоме, причем число генов, вернее генетических маркеров, в первом случае равно единицам, во втором — несколькими десяткам (McKusick, 1975).

Единичные гены были локализованы в хромосомах, в основном предположительно, и с помощью изучения генетических маркеров у лиц с хромосомными структурными вариантами или хромосомными аномалиями (А. Г. Буланов, К. Н. Гринберг, 1973).

Выход проблемы генетического картирования хромосом человека на широкую дорогу быстрого развития был обусловлен разработкой методов гибридизации соматических клеток, которая используется в качестве своеобраз-

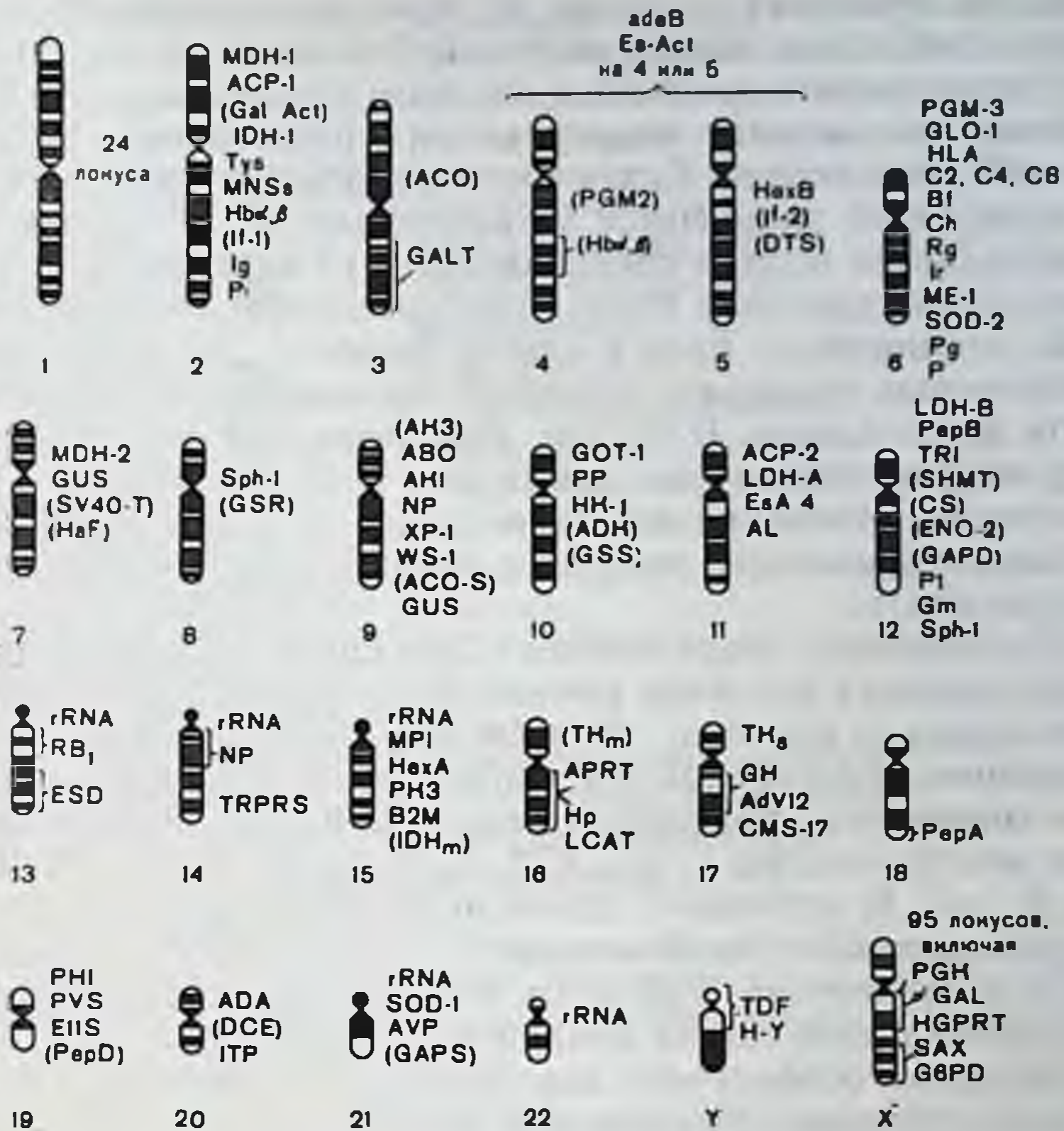


Рис. 12. Генетическая карта хромосом человека (по данным на декабрь 1975 г.). Рисунок цитологической дифференциации взят из собственных данных. Обозначения генетических маркеров приведены в соответствии с рекомендациями Балтиморской международной конференции (1975 г.) по генетическому картированию хромосом. Названия некоторых генов с окончательно недоказанной локализацией помещены в скобки. Карту аутосомы 1 — см. рис. 13.

ного аналога парасексуального процесса (Ruddle, 1972). Этот оригинальный метод определения групп сцепления генов и их локализации в хромосомах позволил обойти трудности применения гибринологического анализа на целом организме человека и оказывается весьма плодотворным.

Сущность метода состоит в следующем. Клетки человека гибридизируют *in vitro* с клетками мыши, китайского хомячка или крысы, в которых отсутствует картируе-

мый ген (признак) человека. В серии клонов размножающихся гибридных клеток ведется наблюдение за состоянием исследуемого признака и составом хромосом человека, причем последние подвергаются постепенной спонтанной элиминации. Связь тестируемого признака (гена) с конкретной хромосомой устанавливается тогда, когда наблюдается полная сцепленность в их поведении, и исчезновение признака объяснимо элиминацией определенной хромосомы. Если в анализ берутся два или более моногенных признака, возникает возможность исследовать их сцепление. В случае использования в анализе структурно измененных хромосом с установленным характером изменения имеются шансы привязать ген не только к хромосоме, но и к ее определенному плечу или его сегменту.

Локализация подавляющего большинства генов в геноме человека выяснена именно этим путем (см. рис. 12). Как видно из рисунка, по исследованным генетическим маркерам картированы все хромосомы человека. Во многих хромосомах определена локализация трех и более генов, это хромосомы 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 21 и X. К аутосоме 1 отнесено 24 генетических локуса, из которых 18 — биохимические или антигенные маркеры, к X-хромосоме — 95, 5 из которых являются генами, определяющими синтез конкретных ферментов.

Выгодная особенность картирования хромосом с помощью гибридов соматических клеток состоит в том, что для анализа может быть взят нормальный генетический маркер, прежде всего биохимический, и таким путем определена локализация большого числа генов, кодирующих синтез ферментных и структурных белков. Вторая важная особенность состоит в том, что метод несет в себе возможность привязать исследуемый ген не только к той или иной хромосоме в целом, но и к конкретному ее цитологическому району. В настоящее время такие районы картируют и нумеруют в определенном порядке на основе избирательного окрашивания сегментов хромосомы (см. главу VI). Первые успехи на этом пути отмечены, например, определением локализации нескольких генов в сегментах аутосом 1 и 2 (рис. 13). По-видимому, этот путь окажется наиболее плодотворным в цитогенетическом картировании хромосом и в конечном итоге поможет составить хромосомные карты, на которых локализация генов будет увязана с локализацией районов гете-

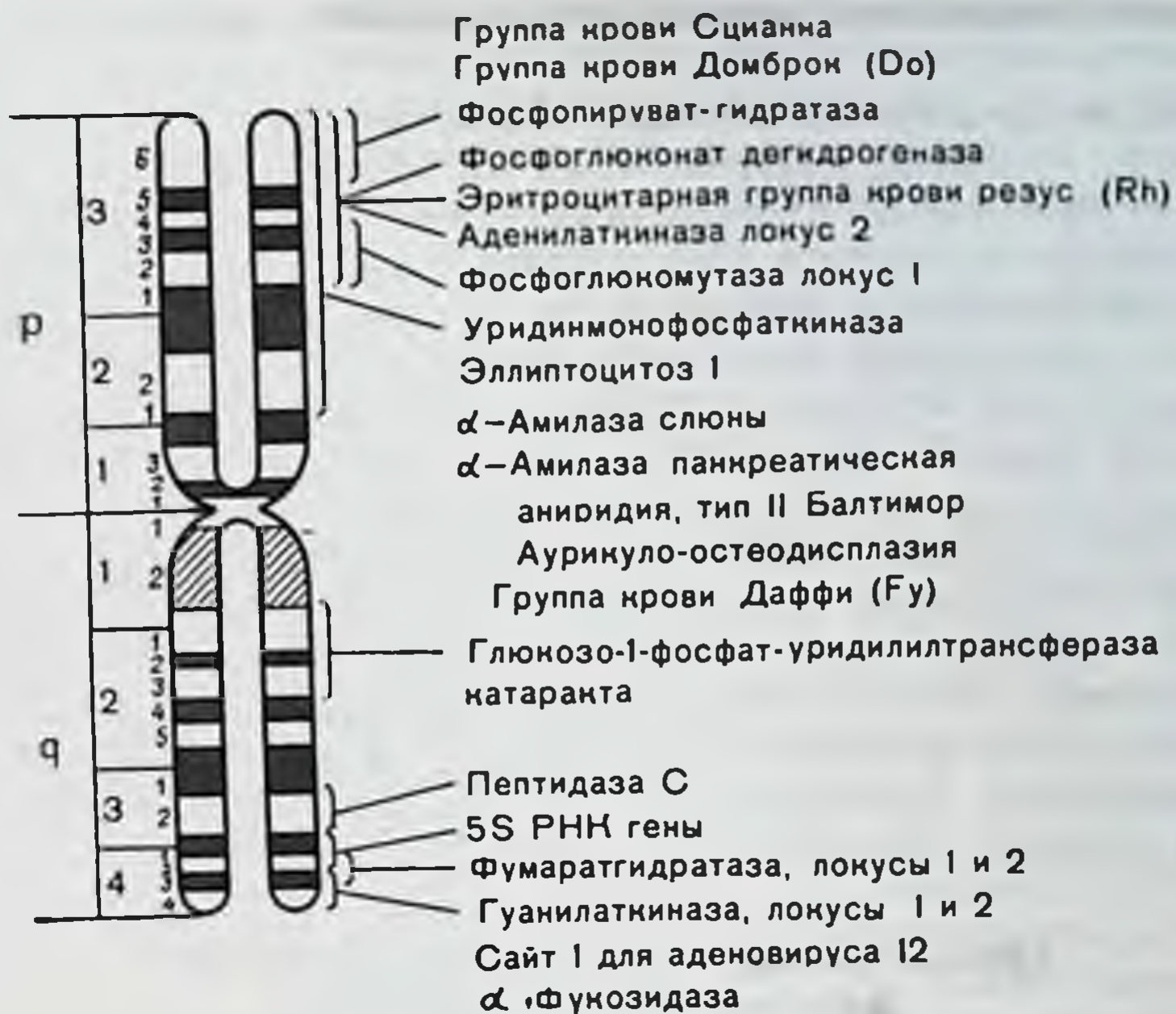


Рис. 13. Генетическая карта аутосомы 1. Цитологическая схема хромосомы взята из рекомендаций Парижской конференции (1971). Отдельные гены локализованы в определенных сегментах хромосомы.

рохроматина — эухроматина. Пока же на основании имеющихся генетических данных и с учетом цитологических и некоторых других сведений о локализации гетерохроматина можно с уверенностью сказать, что из хромосом человека Y-хромосома несет мало структурных генов, особенно дистальная часть ее длинного плеча.

Еще один метод, позволяющий определить локализацию многократно повторяющихся генов, — метод гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, успел внести свой вклад в создание цитогенетических карт хромосом. Мы подробнее будем говорить о полученных с его помощью данных в главе V, поскольку этот метод, строго говоря, не является генетическим. Упомянем здесь лишь о том, что этим путем в аутосоме 1, в дистальной трети ее длинного плеча, локализованы гены 5S РНК, а в аутосомах 13—15 и 21—22, в коротких плечах, — гены 18S и 28S РНК (см. главу V).

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ХРОМОСОМНОГО ДИСБАЛАНСА

Клинико-цитогенетические сопоставления, проведенные на человеке, дают богатый материал для выработки представлений о сравнительной генетической «ценности» хромосом человека и их участков. Разумеется, законченные обобщения в этой области цитогенетики человека пока невозможны, поскольку: во-первых, накопление необходимого материала приняло целенаправленный характер лишь в последние годы благодаря появлению возможности индивидуализировать хромосомы и их участки, во-вторых, фенотипические последствия дисбаланса в той или иной хромосоме или ее районе лишь отчасти могут служить показателем степени их генетической инертности. Более определенные выводы можно сделать, сопоставляя генетические данные с цитологическими критериями структурно-функциональной значимости таких районов (Noehn, 1975).

Хромосомные изменения без заметного фенотипического эффекта

В результате популяционно-цитогенетических безвыборочных обследований больших групп населения твердо установлено существование среди фенотипически нормальных индивидов определенного хромосомного полиморфизма. Большая его часть определяется структурными перестройками типа перичентрических инверсий и реципрокных сбалансированных транслокаций, при которых трудно судить об изменении баланса хромосомного материала. Чисто цитологические методы для такого суждения не всегда надежны, принимая во внимание существование изменчивости размеров хромосом, в частности существование физиологического гетероморфизма гомологов.

Имеется, однако, группа структурных изменений, которую можно с большой определенностью квалифицировать как изменения в количестве хромосомного материала без заметных отрицательных последствий для психического, соматического или полового развития индивидов — их носителей. В эту группу входят, во-первых, изменения районов вторичных перетяжек в аутосомах 1 и 9, которые уже разбирались нами ранее с точки зрения состояния конденсации таких районов (см. с. 36 и 37 гла-

вы II). К настоящему времени описано много десятков семей, члены которых наследуют увеличенные блоки околоцентромерного гетерохроматина 1qh⁺ и 9qh⁺. Если первоначально не исключалось, что такое увеличение связано исключительно с деконденсацией этих районов, то сегодня, после применения методов С-окраски (Holzer, Rosenkranz, 1972; Gardner e. a., 1974; Madan, Bobrow, 1974) и гибридизации ДНК:РНК *in situ* (Jones, Corneo, 1971), не остается сомнений в возможности дву- и трехкратного изменения абсолютного количества содержащегося в районах материала.

Этими двумя хромосомами явление не ограничивается. В настоящее время цитогенетика, будучи вооруженной методами выявления структурного гетерохроматина по его специфической окраске, раскрыла перед собой интереснейшую область нормального наследственного хромосомного полиморфизма человека, который определяется вариабельностью размеров околоцентромерного и иного гетерохроматина если не всех, то большинства хромосом (см. с. 142 и 149 главы VI). Можно с большой долей приближения к истине предположить, что такая вариабельность определяется, по крайней мере частично, приобретением или утратой хромосомного материала. Отсутствие при этом неблагоприятных влияний на фенотип служит генетическим доказательством правомочности представления о бедности структурными генами околоцентромерного гетерохроматина в хромосомах человека. Изучение вариабельности этого хроматина в большинстве хромосом сдерживается тем, что при небольших размерах важны количественные методы оценки его изменчивости, которые пока не разработаны.

Еще одну группу хромосомных районов, изменение баланса которых не влечет за собой заметных неблагоприятных последствий для индивида, составляет материал коротких плеч акроцентрических хромосом. Одним из проявлений таких изменений является полиморфизм индивидов по размерам и форме спутников. Давно было показано, что число и размер спутников — довольно индивидуальная характеристика кариотипа. При исследовании монозиготных и дизиготных близнецов показано, что число, размеры и форма спутников наследуются по закону Менделя. Описаны варианты акроцентрических хромосом с особенно крупными спутниками или крупными короткими плечами, число их носителей составляет около

1—3% в общей популяции человека. Увеличение количества хромосомного материала показано в таких случаях с помощью окраски на структурный гетерохроматин (Yoder e. a., 1974, и др.), а также методом гибридизации ДНК:РНК *in situ* (Evans e. a., 1974) и в растворе (Bross, Krone, 1973). По материалам Nielsen с сотр., которые обследовали несколько тысяч человек в общей популяции, с частотой 0,5—1 на 1000 встречаются индивиды с делецией спутников (Dps — или Gps —) также без заметного влияния на фенотип (Nielsen e. a., 1974).

В популяционных исследованиях давно отмечалась встречаемость фенотипически нормальных индивидов с робертсоновскими транслокациями акроцентрических хромосом в той или иной комбинации. Тщательное изучение таких случаев с применением окрасок на гетерохроматин (Friedrich, Nielsen, 1974, и др.) и с определением количества рибосомной ДНК методом гибридизации (Dittes e. a., 1975) принесло убедительные доказательства утраты части материала коротких плеч.

Из последующих глав будет видно, что короткие плечи акроцентрических хромосом содержат структурный гетерохроматин, обогащенный сателлитной ДНК, и содержат цистроны рибосомной РНК. Поэтому не удивительно сравнительно легкая переносимость индивидом утраты части такого материала. Однако за какими-то пределами можно ожидать и неблагоприятного эффекта. Как известно, мутация *bobbed* у дрозофилы оказалась результатом частичной делеции рибосомных цистронов и именно этим путем повлияла на фенотип.

Особенно широкие колебания в количестве хромосомного материала при сохранении нормального развития, в том числе полового, отмечены для Y-хромосомы. Соответствующие наблюдения весьма многочисленны и касаются описания как необычно крупных Y-хромосом, близких по размерам D-хромосомам, так и мелких. Среди последних имеются случаи делеции длинного плеча хромосомы *de novo*. Наследуемость таких хромосом с сохранением нормального фенотипа, включая половую дифференцировку, хорошо документируется описаниями изолированных популяций или многих поколений одного пра-родителя, в которых мужчины обладают маленькой Y-хромосомой (Genest, Lejeune, 1972). В свете цитологических и биохимических данных последних лет о том, что большая часть длинного плеча Y-хромосомы состоит из

структурного гетерохроматина и содержит сателлитные ДНК (см. главы V и VI!), указанные здесь цитогенетические параллели не вызывают удивления.

Хромосомные изменения с фенотипическим эффектом

Область хромосомной патологии человека исключительно богата материалом для проведения сопоставлений между типом хромосомных изменений и характером фенотипических отклонений. До начала 70-х годов такие сопоставления были возможны главным образом для случаев изменения в числе хромосом, причем из-за ограниченных возможностей идентификации хромосом, в основном для гоносом и аутосом групп А, В, D, Е и частично G. Имеющиеся сейчас возможности индивидуального распознавания всех хромосом человека, а в ряде случаев их сегментов создали условия для быстрого накопления материала по всем аутосомам, по случаям не только полных трисомий или моносомий, но и частичных (см. с. 150 главы VI).

Вероятность, с которой может происходить нерасхождение хромосом или нарушение их структурной целостности в гаметогенезе, по-видимому, приблизительно одинакова для разных хромосом набора. Поэтому можно полагать, что неодинаковая частота численных или структурных аномалий по индивидуальным хромосомам, с которыми реально приходится встречаться у человека, в постнатальном периоде отражает интенсивность элиминации аномалий в эмбриогенезе. Другими словами, анализ таких частот с параллельной оценкой степени фенотипических отклонений от нормы может быть использован для суждения о генетической важности хромосомы или ее района и отчасти о возможном носительстве ими генетически неактивного материала.

На основании имеющихся данных такую оценку пока следует делать с большой осторожностью. Используя данные литературы, в частности обобщенные в работах по популяционной цитогенетике, которые выполнены на разных контингентах живорожденных, мертворожденных и материале спонтанных аборт (Н. П. Кулешов, В. И. Алехин, 1974; А. М. Кулиев, 1974; Lubs, Ruddle, 1970; Hamerton e. a., 1972; Vochko e. a., 1975, и др.), можно дать следующую сугубо предварительную оценку генетической значимости индивидуальных хромосом.

Аутосомы

Полные моносомии по всем аутосомам приводят к летальному исходу в раннем эмбриогенезе. Трисомии разных аутосом имеют разный фенотипический эффект. Полные трисомии 1, 11, 12, 17, 19 и 20 всегда оказывают летальный эффект, так как они не выявлены даже в материале спонтанных аборт. Ранний летальный эффект в эмбриогенезе оказывают трисомии 2, 3, 4, 5, 6, 10, 14, 15 и 22. В этом случае при трисомии аутосом 2—5 и 16 находят пустые зародышевые мешки, а трисомии 14, 15 и 22 вызывают тяжелые аномалии развития эмбриона. К числу сублетальных трисомий, носители которых могут появляться на свет живорожденными, относятся трисомии 7, 8, 9, 13, 18 и 21. Наиболее жизнеспособными являются эмбрионы при наличии трисомий по аутосомам 13 (синдром Патау), 18 (синдром Эдвардса) и 21 (синдром Дауна), причем пациенты с первыми двумя синдромами редко живут более года, тогда как пациенты с болезнью Дауна вполне жизнеспособны, так как не имеют тяжелых аномалий развития.

В 1964 г. Yunis с соавт. была высказана гипотеза о том, что среди живорожденных встречаются трисомии по тем хромосомам, которые особенно богаты генетически неактивным материалом. Сейчас мы можем сказать, что в общем виде эта точка зрения оказалась правильной, именно аутосомы 13, 18 и 21 обладают, по цитологическим тестам, значительными участками гетерохроматинового материала. Возможно, эту корреляцию в определенных рамках можно было бы распространить и на другие аутосомы, не забывая, конечно, о значении ряда дополнительных факторов (размер хромосомы, генный состав и др.). Интересно, например, отметить, что по таким показателям, как время репликации, поведение в митотическом цикле и отношение к красителям, в группе С большим количеством гетерохроматинового материала отличаются аутосомы 8 и 9. Из аутосом группы С именно эти иногда обнаруживаются среди живорожденных в трисомном состоянии.

Изменение баланса по полным аутосомам слишком велико, чтобы не иметь серьезных последствий для их носителя, и если некоторые из них и совместимы с живорождением, то соответствующие индивиды имеют множество аномалий развития. По-видимому, более ценную ин-

формацію о генетической значимости участков хромосомы можно будет получить при изучении фенотипа у лиц с частичными трисомиями или моносомиями. Эта серьезная проблема начала изучаться недавно, и сейчас нет фактических данных для выработки каких-либо определенных представлений. Те частичные трисомии или моносомии, которые описываются, т. е. которые встречаются наиболее часто, касаются чаще всего хромосом, по которым описаны совместимые с живорождением полные трисомии (синдромы 13q—, 18q— и 18p—, 21-делеции и др., см. главу VI). Здесь также легко увидеть, что жизнеспособные, с относительно нетяжелыми аномалиями развития частичные аутосомные делеции или дупликации проходят по хромосомным плечам или более мелким районам, содержащим большое количество гетерохроматинового материала.

Половые хромосомы

Дисбаланс по половым хромосомам — самая частая и наиболее переносимая индивидами форма хромосомного дисбаланса, что хорошо согласуется с цитологическими данными о значительном содержании в гоносомах генетически неактивного материала.

Полисомии по X-хромосоме не только совместимы с жизнеспособностью их носителей, но и не сопровождаются существенными пороками развития. Фенотипические проявления этого дисбаланса заключаются преимущественно в нарушениях половой дифференцировки, в умственном и общем физическом недоразвитии с минимальными соматическими отклонениями. Лишь при полисомиях 48,XXXX, 48,XXXY, 49,XXXXX, 49,XXXXY наблюдается более глубокая олигофрения и появляются соматические аномалии.

При моносомии по X-хромосоме, по ряду данных, наблюдается летальный эффект в эмбриогенезе более чем в 90% случаев (Boicè, Boicè, 1974). Обычно же живорожденные носители этой моносомии при достижении половозрелого возраста имеют нетяжелые соматические аномалии, общее физическое недоразвитие (синдром Шерешевского—Тернера).

Высказывается предположение, что отклонения в умственном, физическом и половом развитии при X-полисомиях и X-моносомиях, утяжеляющиеся с нарастанием дис-

баланса по материалу этих хромосом (рис. 14), являются следствием нарушения баланса гетерохроматинового материала как такового (Polani, 1969; Hamerton, 1971; Barlow, 1973), поскольку они касаются в первую очередь количественных, интегральных признаков.

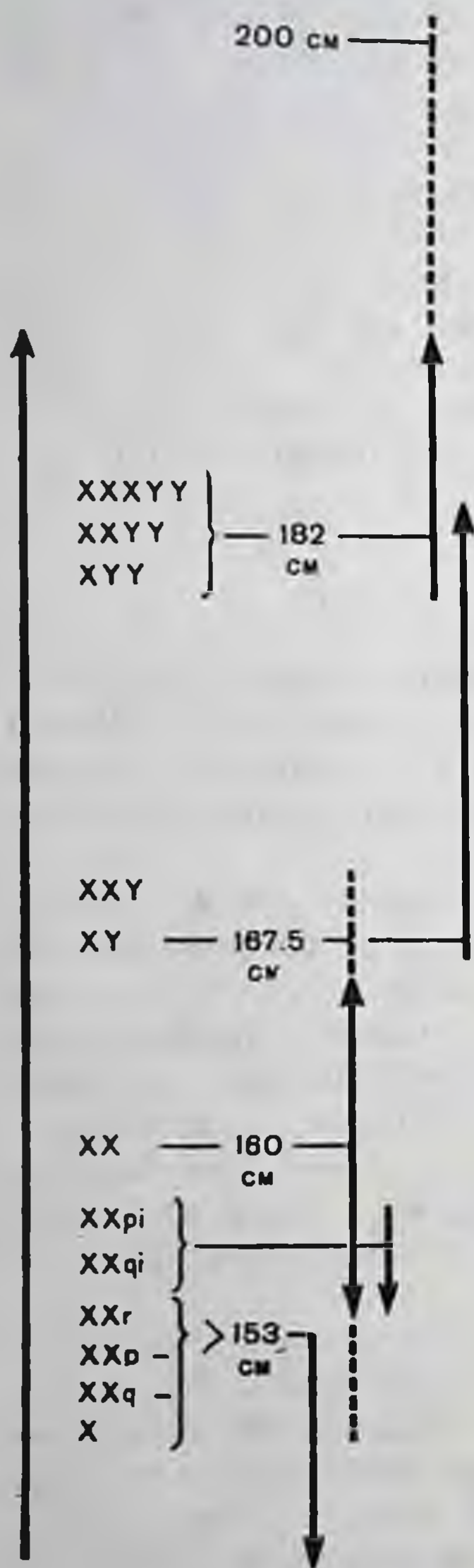


Рис. 14. Схема влияния различных аномалий в системе половых хромосом на рост носителя аномалии (Hamerton, 1971).

Увеличение числа Y-хромосом имеет еще меньшие последствия для фенотипа. В литературе последних лет продолжается дискуссия в отношении возможного влияния дополнительной Y-хромосомы (47, XYY) на психосоциальное поведение индивидов и дифференцировку гонад, и, по-видимому, такое влияние возможно (Г. Г. Мирзаянц, 1974; Hamerton, 1971). Остается, однако, фактом, индивиды 47, XYY нередко обнаруживаются в общей популяции лишь при скринирующем карiotипировании, имея нормальный фенотип. Индивиды с хромосомной конституцией 48, XYYY единичны, у них отмечается ряд признаков нарушения соматического развития, и, по-видимому, полового, но из-за малочисленности исследованных случаев определенное заключение было бы преждевременным (Schoepflin, Genterwall, 1972, и др.).

В главе I уже упоминалось о важном вкладе, который был сделан в формирование современных представлений о генетическом значении гетерохроматинизации цитологическом и генетическом, при изучении состояния двух X-хромосом в женских

клетках млекопитающих. Как известно, основные представления по этому вопросу были сформулированы М. Lyon в 1961 г. на основании изучения X-хромосом мыши. Исследованию этой проблемы на человеке посвящено много оригинальных и несколько обзорных работ (А. Ф. Захаров, 1968; McKusick, 1962; Giannelli, 1970; Lyon, 1972; Ford, 1973). Поэтому мы не будем повторять здесь хорошо известные факты и их интерпретацию. Коснемся только вопроса о равномерности инактивации по длине X-хромосомы. Разными методами генетического картирования определено, что с X-хромосомой связано около 90 патологических наследственных состояний (McKusick, 1975). В X-хромосоме локализованы также гены, кодирующие выработку пяти ферментов и антигена Xg^a . На примере ферментов гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы показано, что оба аллеля функционируют в соматических клетках лишь на первых стадиях деления оплодотворенной яйцеклетки, а у сформированных организмов — лишь в ооцитах в профазе первого мейотического деления (Epstein, 1972; Gartler e. a., 1973). В соматических клетках сформировавшегося организма один из аллелей инактивирован. Исключение из правила полной инактивации генов одной из двух X-хромосом особей женского пола, возможно, касается $Xg(a)$, определяющего продукцию антигена Xg^a (Ducos e. a., 1971). Поэтому сегодня приходится допускать возможность неполной инактивации X-хромосомы (Lyon, 1974). Принятие этого положения согласуется с представлением, выработанным в результате многолетнего изучения мозаичного эффекта положения в X/аутосомных транслокациях у мыши, о существовании в инактивированной X-хромосоме центра и градиента инактивации (Eicher, 1970, и др.).

В цитогенетике человека накопилось большое количество описаний индивидов с X/аутосомными и X/X транслокациями, тщательный фенотипический и цитологический анализ которых свидетельствует в пользу существования центра и градиента инактивации и в X-хромосоме человека. Первый серьезный анализ и обобщение литературы по этому вопросу сделаны Therman и Patau (1974). Поскольку основное доказательство строится на данных анализа включения метки (времени репликации ДНК) в X/аутосомных транслокациях, этот вопрос будет

подробно разобран в следующей главе (см. с. 86). Можно лишь подчеркнуть, что пока нет точных данных о характере градиента и его распределении по длине X-хромосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выработки представлений о сравнительной генетической ценности разных хромосом человека и их индивидуальных районов используются оба методических подхода, успешно апробированные на других биологических видах: цитогенетическое картирование хромосом и сопоставление степени и характера фенотипических отклонений со степенью и характером хромосомного дисбаланса. Классический метод составления цитогенетических карт, основанный на гибридологическом анализе индивидуальных особей, ограничен в применении к человеку. Основная информация о расположении генетических локусов в хромосомах человека получена путем использования гибридов соматических клеток человека с клетками некоторых видов грызунов. Те или иные генетические маркеры отнесены ко всем хромосомам человека. Преимущество использования гибридов соматических клеток в картировании хромосом состоит, в частности, в том, что: а) определима локализация генов, кодирующих синтез нормальных белков, б) локализация может быть сужена до сравнительно небольшого района хромосомы, маркируемого цитологически.

Фактического материала по цитогенетическому картированию человеческих хромосом пока недостаточно, чтобы установить характер распределения менделирующих генов по длине тех или иных хромосом. Для ответа на этот вопрос большое значение имеет изучение фенотипического эффекта хромосомного дисбаланса. Тщательное обследование фенотипа соответствующих индивидов — носителей хромосомной аномалии в сочетании с появившейся в последние годы возможностью точного описания характера хромосомной перестройки таят в себе почти неиспользованные потенциальные возможности подобного феногенетического анализа. Из имеющихся данных можно сделать вывод, что существует неравноценность в содержании структурных генов хромосом человека между собой, а также участков в пределах одной хромосомы. По обедненности структурными генами выде-

ляются: а) околоцентромерные районы аутосом 1, 9 и 16, известные по цитологическим тестам как гетерохроматиновые; б) короткие плечи акроцентрических хромосом 13—15 и 21—22; в) длинное плечо Y-хромосомы. Такое заключение может быть сделано на основании многочисленных наблюдений о значительной вариабельности размеров указанных районов хромосом без заметных неблагоприятных фенотипических последствий. Количество хромосомного материала при этом может изменяться в несколько раз. Количественная вариабельность гетерохроматиновых районов является главной причиной широкого хромосомного полиморфизма в нормальной человеческой популяции. Феноменология хромосомного полиморфизма, его границы и биологическое значение только начинают выясняться. Однако уже сегодня молекулярная цитогенетика дает удовлетворительное объяснение полиморфизму: именно в полиморфных хромосомных районах содержится ДНК с многократными копиями повторяющихся последовательностей нуклеотидов, которые либо не обладают способностью к транскрипции (гетерохроматиновые районы хромосом 1, 9, 16, Y), либо представлены большим числом одинаково транскрибируемых генов (ядрышкообразующие районы аутосом 13—15 и 21—22). С другой стороны, ряд аутосом (1, 2, 3, 6 и др.) выделяются тем, что дисбаланс по содержащемуся в них генетическому материалу особенно катастрофичен для развивающегося эмбриона.

В ближайшее время можно ожидать значительный прогресс в дальнейшем цитогенетическом картировании хромосом и в выяснении феногенетических и кариотипических взаимоотношений.

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТЬ РЕПЛИКАЦИОННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ

ВВЕДЕНИЕ

Целое десятилетие радиоавтографическое изучение репликации ДНК являлось основным источником информации об особенностях функциональной организации отдельных хромосом и их участков у человека. Это было особенно важно потому, что подобная информация могла быть получена на метафазных хромосомах, когда иных подходов к анализу индивидуальных особенностей участков хромосом почти не было.

Сведения по репликационной организации хромосом человека получены на основе изучения включения в хромосомы меченых предшественников ДНК. Методические особенности радиоавтографии хромосом человека описаны в нескольких обзорах, что освобождает от необходимости их изложения (О. И. Епифанова и др., 1977; Schmid, 1965; Miller, 1970; Giappelli, 1970). Напомним здесь некоторые ключевые моменты методики, что облегчит правильное восприятие фактического материала.

Источником делящихся клеток человека для изучения хромосомной репродукции служит, как правило, культура лимфоцитов периферической крови, реже — культура фибробластов кожи или эмбриональных клеток. Тканевая принадлежность клеток должна приниматься во внимание при изучении хронологии репликации ДНК, поскольку имеются сведения о некотором ее различии в клетках разных тканей (С. И. Слезингер и др., 1969, 1974; Gertan, Agopian, 1974). ^3H -тимидин как специфический предшественник ДНК находится вне конкуренции с другими предшественниками в деле изучения репродукции хромосомы. Чтобы составить представление о хронологии репликации ДНК по длине хромосомы, необходимо импульсное введение метки (10—15 мин) в разные промежутки S-периода. В самом простом варианте исследова-

ние может ограничиваться изучением включения метки в начале или конце S-периода. Конец синтетического периода особенно удобен для такого анализа по ряду технических моментов проведения эксперимента, а также потому, что на границе S—G₂ легче отнести метафазную пластинку к определенному этапу S-периода. При изучении последовательности редупликации хромосом в конце S-периода метка может быть введена на более длительное время, до фиксации клеток.

Меченое соединение вводится в культуру на суммарную продолжительность G₂-периода и испытуемого конечного отрезка S-периода.

Весьма ответственным этапом в получении объективных результатов является заключительный этап — анализ распределения метки над хромосомами. Он может быть качественным и количественным. В первом случае оценка распределения метки строится на визуальном анализе, который проводится, как правило, на фотографиях меченых хромосом и тех же хромосом без метки. Если сравниваемые хромосомы или их участки довольно резко отличаются друг от друга по интенсивности метки, визуальный качественный анализ достаточен для суждения о времени их редупликации. Он может дать предварительный ответ на вопрос о межхромосомной асинхронности начала или окончания синтеза ДНК, а также помочь в идентификации хромосомы. Однако для описания последовательности репликации ДНК по длине той или иной хромосомы качественной оценки метки недостаточно. Сведения, имеющиеся по этому вопросу в литературе, получены путем количественного учета распределения зерен серебра над хромосомами (О. И. Епифанова и др., 1977). Относительно малые размеры хромосом человека по сравнению с длиной пробега β-частиц трития и величиной самого зерна диктуют необходимость проведения подсчетов зерен серебра над хромосомой, используя определенную выборку сходно меченых хромосом. Во всех до сих пор выполненных работах единицах длины анализируемой хромосомы выбирается условно. Обычно хромосомное плечо подразделяют на равные по длине сегменты. Для сравнения же хромосом между собой прибегают к оценке относительной интенсивности метки, когда определяют отношение найденного числа зерен к ожидаемому, исходя из относительной длины хромосомы в наборе. Следует подчеркнуть, что конкретные работы по ра-

диоавтографическому изучению синтеза ДНК в хромосомах человека чрезвычайно разнообразны по условиям постановки экспериментов и методам оценки их результатов. Это делает обобщение имеющихся данных затруднительным и отчасти объясняет высказывавшийся скептицизм в отношении возможностей метода радиоавтографии в индивидуализации хромосом человека по хронологии репликации ДНК (Steele, 1969).

В последнее время предложен новый метод оценки репликационной структуры хромосом, в котором не используются ни меченые соединения, ни метод радиоавтографии. Метод основан на обнаружении включения в хромосому аналога тимидина 5-бромдезоксимуридина по ослабленной окрашиваемости соответствующего хромосомного участка. Главное достоинство метода — высокая разрешающая способность, которая лимитируется лишь одним — разрешающей способностью световой микроскопии. Об этом методе и получаемых с его помощью результатах будет сообщено на с. 89.

МЕЖХРОМОСОМНАЯ АСИНХРОННОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Асинхронность редупликации, существующая между хромосомами человека, характеризуется следующими общими чертами. В период синтеза хромосомы вступают относительно синхронно. В расчете на геном в целом интенсивность синтеза повышается к середине S-периода, а к концу его быстро падает, что прежде всего связано с количеством одновременно функционирующих репликонов. Окончание синтеза ДНК в разных хромосомах происходит в разное время, что позволяет говорить о так называемых ранних и поздних хромосомах-редупликантах или их участках. Размер хромосомы не отражается на продолжительности синтеза ДНК в ней, на сроках начала и окончания синтеза. Возможно неодновременное окончание синтеза в гомологичных аутосомах, хотя по этому вопросу имеется определенная дискуссия (А. А. Прокофьева-Бельговская, С. И. Слезингер, 1965; Gilbert e. a., 1966; Sandberg e. a., 1968).

Данные об асинхронности вступления в синтез и выхода из него для хромосом человека были получены в течение первых 4—5 лет после работы Lima-de-Faria с сотрудниками (1961) усилиями исследователей из многих лабораторий мира.



Рис. 15. Распределение ^3H -тимидина в нормальных хромосомах женщины (46, XX). Специфичность локализации метки позволяет дополнительно идентифицировать хромосомы 4, 5, 13, 14, 15, 17, 18 и X. Подробно см. в тексте.

S-периода, активное включение метки наблюдается только на 3—4-м часу. В аналогичных экспериментах с мужскими клетками отмечено сходное по времени запаздывание начала репликации ДНК в Y-хромосоме (Bianchi, Bianchi, 1965; Takagi, Sandberg, 1968).

По результатам ряда работ можно заключить, что аутосомы вступают в синтез ДНК сравнительно синхронно относительно друг друга, однако обстоятельных сведений о степени возможной асинхронности и об очередности вступления разных хромосом не получено (Kikuchi, Sandberg, 1964; Bianchi, Bianchi, 1965; Takagi, Sandberg, 1968). Oskey (1969) на основании количественного анализа зерен серебра делает вывод о комплементарности картины распределения зерен для каждой хромосомы в конце и начале S-периода.

ВНУТРИХРОМОСОМНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Неравномерное включение метки по длине хромосом как в начале, так и в конце S-периода отмечалось всеми проводившими радиоавтографическое изучение редупликации хромосом. Для хромосом 1, 4, 5, 13, 16, 18 и X выявление некоторых асинхронно редуплицирующихся участков оказалось возможным без подсчета зерен серебра. В целом же существующие представления о том, какова последовательность синтеза ДНК по длине индивидуальных хромосом, основаны на результатах немногих работ, в которых проведен количественный анализ распределения метки. Одни из них выполнены на культурах лимфоцитов (Gilbert e. a., 1962; Miller e. a., 1966; Gavosto e. a., 1968; Takagi, Sandberg, 1968; Passgге e. a., 1969; Schnedl, 1973), другие — на культурах фибробластов (А. А. Прокофьева-Бельговская, С. И. Слезингер, 1967; Д. М. Атаева, А. А. Прокофьева-Бельговская, 1974; С. И. Слезингер и др., 1974; Prokofieva-Belgovskaya, Slesinger, 1968; Oskey, 1969, и др.). Большим препятствием для изучения обсуждаемого вопроса была невозможность идентификации большинства хромосом. Это препятствие обойдено в очень немногих работах последнего времени.

Ниже последует описание хронологии синтеза ДНК по длине хромосом лимфоцитов крови и фибробластов человека, как оно вырисовывается на основании опубликованных материалов и собственных неопубликованных

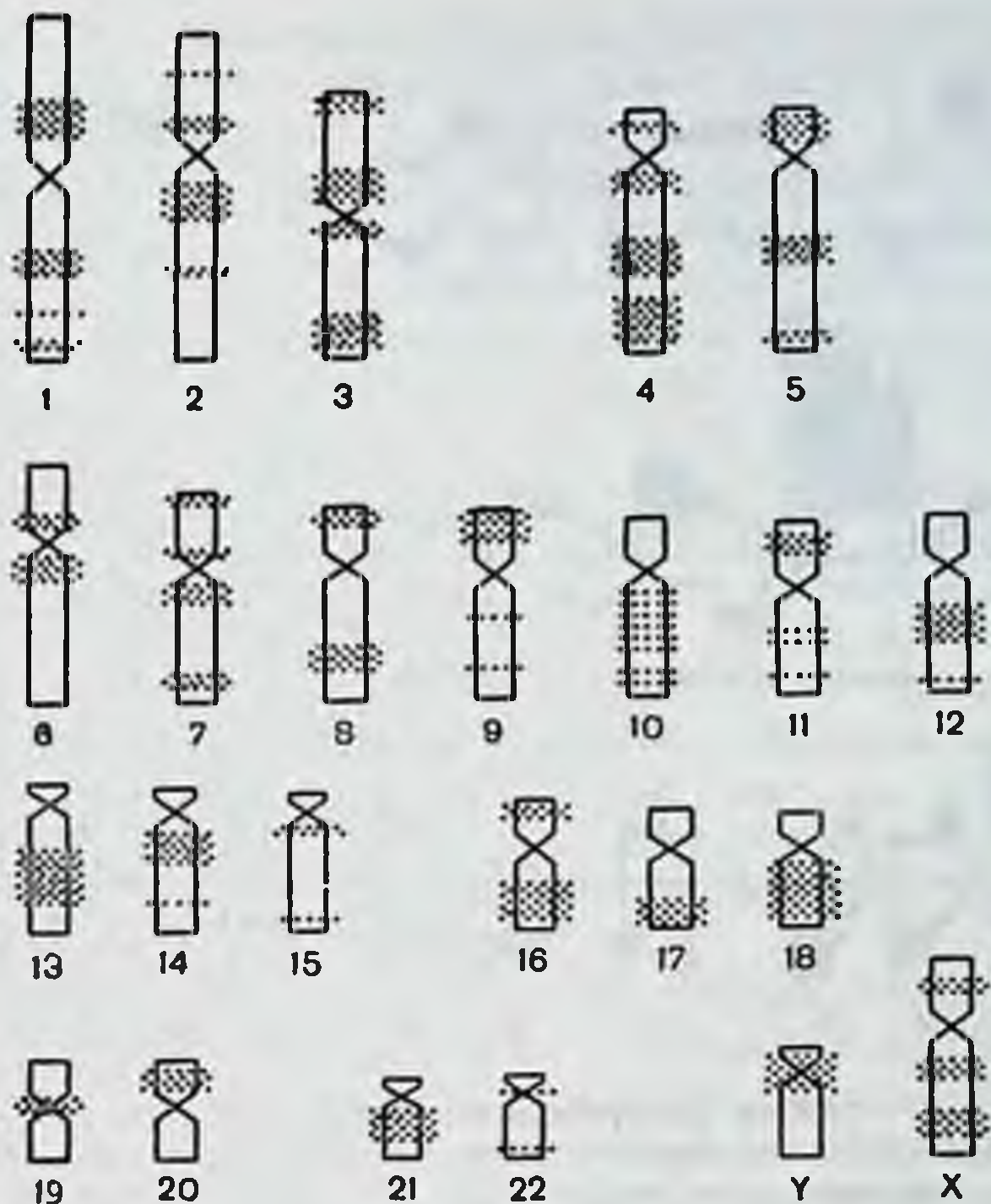


Рис. 16. Схема распределения поздно редулицирующихся районов по длине нормальных хромосом человека, основанная на анализе более чем 100 меченых метафаз. Идентификация хромосом проведена с помощью Q-окраски до покрытия препаратов эмульсией (Schnedl, 1973).

наблюдений автора. Описание иллюстрируется двумя схемами. Одна из них (рис. 16) основана на качественном анализе метки над хромосомами, идентифицированными по окраске (Schnedl, 1973). Вторая схема (рис. 17; Oskey, 1969) получена в результате подсчета зерен серебра и наиболее богата информацией по сравнению с другими опубликованными материалами. При описании будем следовать порядку синтеза от конца к началу S-периода.

Хромосома 1. Данные разных исследователей в общем согласуются. В поздней фазе S-периода метка локализуется преимущественно в проксимальной части обоих плеч. Во многих работах одним из последних в окончании син-



Рис. 17. Гистограммы распределения относительного количества зерен серебра по длине хромосом (горизонтальная линия против 0 на шкале) отдельно для поздней части S-периода (над линией хромосомы) и для ранней его части (под линией хромосомы). В каждом случае проанализировано по 40 клеток индивида 47, XXУ. Стандартная ошибка для каждого хромосомного сегмента обозначена точкой. Районы с плотностью зерен серебра выше единицы зачернены (Oskey, 1969).

теза описывается околоцентромерный гетерохроматиновый район длинного плеча, что особенно демонстративно, когда этот район увеличен. По мере продвижения от конца S-периода небольшой участок поздней метки обнаруживается в длинном плече на границе терминальной и средней трети (Oskey, 1969). Далее наряду с уменьшением метки в проксимальных участках плеч появляется метка в дистальных их половинах. В первой половине S-периода отмечается преимущественная редупликация дистальных районов плеч. На основании приводимых в литературе материалов можно заключить, что в этой аутоosome линейная асинхронность синтеза ДНК четко выражена между теломерными и околоцентромерным районами. Однако более детальное описание по длине хромосомы затруднено.

Хромосома 2. Окончание синтеза ДНК в участках этой хромосомы не столь асинхронно, как в предыдущей. Отмечено более раннее окончание синтеза в теломерных районах обоих плеч и в дистальной части длинного плеча (Schmid, 1963; Gavosto e. a., 1968; Oskey, 1969). Однако и в этих работах отмечается, что запаздывание синтеза в околоцентромерном районе хромосомы 2 не очень выражено. Начало редупликации сходно с таковой в хромосоме 1: активно метятся теломерные участки, слабая метка имеется в проксимальных районах плеч. Очевидно, асинхронность репликации ДНК заметна в этой хромосоме лишь при сравнении теломерных и отчасти центромерных районов между собой и с остальными районами. Тот факт, что на большей части своей длины хромосома 2 включает метку на протяжении почти всего S-периода, позволяет предполагать, что внутренняя асинхронность синтеза в ней значительна, но различающиеся по этому признаку участки малы и не выявляются радиоавтографически.

Хромосома 3. Будучи почти равноплечей, эта хромосома характеризуется симметричностью редупликации обоих плеч на всех изученных этапах цикла. Порядок редупликации участков напоминает таковой в хромосоме 1, но имеются и различия. Самыми последними оканчивают синтез околоцентромерные районы. Среди поздних по окончанию описываются и теломерные районы (Schmid, 1963; Gavosto e. a., 1968). По заключению Oskey (1969), такое запаздывание синтеза сильнее выражено в коротком плече. Срединные части обоих плеч заканчивают синтез сравнительно рано. В начале и первой половине S-периода основное включение метки происходит в теломерные участки плеч, постепенно нарастая в срединных участках. В целом хромосома 3, как и предыдущие, весьма асинхронна по длине в отношении времени синтеза ДНК, однако различающиеся участки, по-видимому, малы и точная их локализация затруднительна.

Хромосомы 4 и 5. На гистограммах распределения поздней метки, построенных Gavosto с соотр. (1968), по расположению интенсивно меченных участков эти хромосомы не различаются. К таким участкам относят все короткое плечо, околоцентромерный район и три примерно равной величины участка вдоль длинного плеча. Oskey (1969) приводит несколько иные данные. Корот-

кие плечи обеих хромосом заканчивают редупликацию поздно, но различно для 4 и 5 аутосомы (см. рис. 17). В длинных плечах поздняя метка располагается более или менее равномерно, с тенденцией к усилению в дистальном участке плеч. Разница между хромосомами состоит в более раннем выходе из синтеза части длинного плеча в аутосоме 5. Репликация ДНК в первой половине синтеза начинается и протекает без заметной линейной асинхронности между той и другой хромосомами.

Резюмируя, можно сказать о большом сходстве обеих пар по хронологии редупликации, о значительной расчлененности обоих плеч на участки с разным временем редупликации, о трудности картирования этих хромосом по расположению таких участков.

Хромосомы 6—12. В подавляющем числе работ отсутствуют данные по этим аутосомам, что объясняется невозможностью идентификации этих хромосом и большим сходством картин распределения метки для всех семи членов этой группы. Следовательно, как мы уже говорили ранее, эти хромосомы не различимы и на радиоавтографах. Имеется три работы, где все-таки сделана попытка количественно или качественно оценить порядок синтеза ДНК по длине С-хромосом после их условной идентификации на основании размеров и формы (Gavosto e. a., 1968; Oskey, 1969) или по дифференциальной окраске (Schnedl, 1973). В первой из них в конце S-периода отмечается интенсивный синтез ДНК в проксимальной трети короткого и проксимальной половине длинного плеч аутосомы 6. Остальные хромосомы существенно не различались, имея более интенсивную метку в дистальных участках длинных плеч и в районах центромер. Oskey (1969) приводит гистограммы распределения зерен серебра по длине всех аутосом (см. рис. 17), показывающие хотя и весьма сходный, но с индивидуальными особенностями тип распределения в разных хромосомах. Более объективными, возможно, являются наблюдения Schnedl (1973), поскольку в его работе хромосомы были идентифицированы на основании рисунка G и Q-окрашивания (см. рис. 16). Можно предполагать, что в общем виде репликационная структура для разных С-хромосом очень сходна и включает достаточно мелкие различающиеся по времени синтеза участки.

Хромосома 13. Аутосомы 13—15 различаются радиоавтографически, и это позволило получить определенный материал по внутрихромосомному расписанию синтеза ДНК в каждой из них. Под номером 13 значится наиболее запаздывающая в синтезе хромосома группы D. Самыми поздними являются два района в длинном плече, в дистальных двух третях его, район короткого плеча и центромеры. Распределение метки в первую половину S-периода не столь асинхронно, дистальная часть метится слабее проксимальной.

Хромосома 14. В этой аутосоме последними редуцируются короткие плечи, район центромеры и проксимальная часть длинного плеча, хотя небольшое число зерен отмечается и в теломерном районе длинного плеча. Рисунок включения метки на ранних этапах периода синтеза противоположен описанному.

Хромосома 15. Как уже говорилось, хромосома 15 начинает репликацию и заканчивает ее сравнительно рано. Порядок включения метки по ее длине точно не определен. По-видимому, небольшие участки поздно редуцирующегося материала, помимо района коротких плеч и центромеры, могут быть и в дистальных участках длинного плеча.

Итак, хромосомы группы D, являясь более мелкими по сравнению с хромосомами групп А—С, имеют более крупную дифференциацию на рано и поздно редуцирующиеся районы, благодаря чему радиоавтография в состоянии выделить положение альтернативных участков. Общим для всех трех аутосом является сравнительно поздняя редупликация коротких плеч и центромерных районов.

Хромосома 16. Эта аутосома имеет специфическую картину включения метки. На радиоавтографах поздних стадий периода синтеза выделяется интенсивным включением метки проксимальный район длинного плеча. В этот период дистальный участок этого плеча и короткое плечо не метятся. На начальных этапах синтеза включение метки противоположно. Более детализированная схема редупликации этой хромосомы неизвестна.

Хромосома 17. Являясь ранним по окончанию синтеза элементом кариотипа, эта хромосома противоречиво охарактеризована по внутренней хронологии синтеза. Gavosto с сотр. (1968) выделяют два пика поздней метки: в районе центромеры и на дистальной половине

длинного плеча. По-видимому, в дополнение к этим районам поздний синтез осуществляется и в коротком плече (Prokofieva-Belgovskaya, Slezinger, 1968). Oskey (1969) описывает гомогенную картину включения метки на поздних этапах синтеза, но выделяет дистальный участок длинного плеча как самый ранний по началу синтеза (см. рис. 17).

Хромосома 18 также недостаточно изучена в отношении хронологии редупликации ее участков. По материалам Gavosto и Oskey, можно говорить, во-первых, о более раннем начале и окончании редупликации короткого плеча в сравнении с длинным, во-вторых, о довольно гомогенном позднем окончании синтеза ДНК на протяжении почти всего длинного плеча (см. рис. 17). Prokofieva-Belgovskaya, Slezinger (1968) привели иные данные, подчеркивая раннее начало синтеза в теломерных районах обоих плеч.

Хромосомы 19—20. Имеющиеся в литературе описания немногих попыток определить порядок репликации по длине этих хромосом противоречивы. По данным одних авторов (Prokofieva-Belgovskaya, Slezinger, 1968; Oskey, 1969), более рано заканчивают синтез дистальные половины обоих плеч, они же начинают синтез ранее околоцентромерной срединной зоны. Приводятся и другие наблюдения, когда поздняя метка в дистальных сегментах кажется более сильной, чем в срединной зоне. Идентифицируя эти хромосомы по окраске, Schnedl (1973) обнаруживает четкое различие между ними по включению поздней метки, как это следует из данных, представленных на рис. 16.

Хромосомы 21—22. Выше упоминалось о существовании небольшой, но при определенных условиях улавливаемой асинхронности в окончании синтеза ДНК в аутосомах 21 и 22. Одинаковы или нет обе пары по порядку редупликации в участках по их длине? Радиоавтография не дала убедительного ответа на этот вопрос, так как слишком малы хромосомные сегменты с предполагаемым различием времени репликации ДНК. Построенные гистограммы весьма субъективны (см. рис. 17). Schnedl (1973) выделяет в качестве особенно запаздывающего в синтезе участка большую часть длинного плеча хромосомы 21 (см. рис. 16).

X-хромосома. Наиболее полные сведения по внутрихромосомной асинхронности синтеза ДНК получены на

генетически инактивированной X-хромосоме. Giannelli первым выделил три рисунка распределения поздней метки в этой хромосоме: сплошное равномерное расположение метки, хромосомы с свободным от метки околоцентромерным районом и хромосомы, меченые только в проксимальной части длинного плеча. Giannelli (1970) удалось показать, что эти картины отражают последовательные стадии окончания редупликации X-хромосомы. Этим визуальным картинам окончания синтеза соответствуют гистограммы и кривые количественного распределения метки, отличающиеся в разных работах лишь деталями (Gavosto e. a., 1968; Oskey, 1969; Passarge e. a., 1969). Такой анализ позволил выделить в длинном плече, помимо проксимального района, дистальный узкий участок особенно поздней редупликации. Достаточно убедительные данные по внутрихромосомной асинхронности окончания синтеза в гетерохроматизированной X-хромосоме подкрепляются сведениями о том, что в начале S-периода, между 2-м и 3-м часом, метка включается главным образом в короткое плечо и лишь позднее к синтезу подключается длинное плечо (Priest, 1968).

В отношении хронологии редупликации генетически активной X-хромосомы сведения скудны. По наблюдениям Schmid (1963), X-хромосома может быть выделена среди группы 6-X-12 по довольно интенсивной и диффузной метке в длинном плече при сохранении метки в коротком; к самому концу S-периода от метки раньше освобождается короткое плечо. По-видимому, в длинном плече наиболее поздней также является проксимальная зона.

Y-хромосома. Малые размеры этой хромосомы затрудняют однозначную характеристику времени ее репликации по длине. Тем не менее к настоящему времени сложилось определенное представление, впервые намеченное Schmid (1963). Большая часть длинного плеча Y-хромосомы, его дистальные примерно две трети относятся к поздно реплицирующемуся материалу. Именно этот район начинает репликацию ДНК со значительным, на 2—3 ч, опозданием, зато редуплицируется с большой скоростью. Самой запаздывающей в синтезе является средняя узкая зона этой части, иногда имеющая вид вторичной перетяжки. Короткое плечо и проксимальная часть длинного заканчивают редупликацию раньше. Как рано этот район начинает синтез, сказать трудно. Дис-

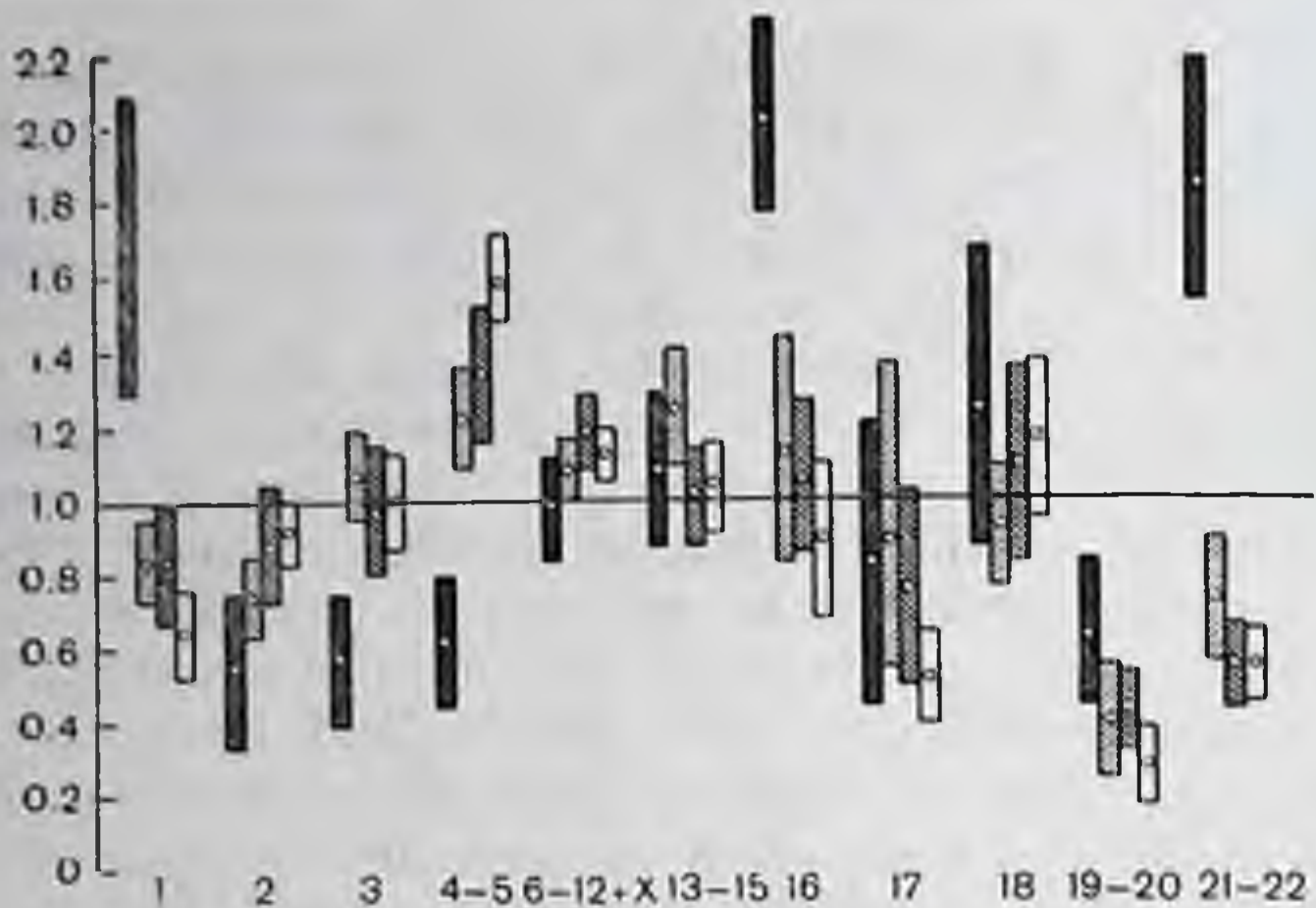


Рис. 18. Распределение коэффициента K (отношение найденного количества зерен серебра к ожидаемому) для хромосом в конце S -периода. Импульсное введение метки. Ось абсцисс: номера хромосом. Ось ординат: коэффициент K с доверительным интервалом 95%. Черные столбики — эмбриональные фибробласты, косая штриховка — лейкоциты новорожденной девочки, штриховка в квадрат — лейкоциты молодой женщины, светлые столбики — лейкоциты старой женщины (С. И. Слезингер и др., 1974).

сонансом к этому представлению является сообщение Schnedl (1973) о якобы более раннем окончании репликации в дистальной половине Y -хромосомы по сравнению с коротким плечом и проксимальным участком длинного (см. рис. 16).

Большой теоретический интерес представляет вопрос, различается ли порядок хромосомной редупликации в разных по дифференцировке и специализации клеточных типах. Известны лишь два серьезных исследования, проведенные на клетках человека, результаты которых указывают на такую возможность. Различия были найдены для хромосом 1, 2, 4, 5 и 16 при сравнении лимфоцитов крови и эмбриональных фибробластов (рис. 18) (С. И. Слезингер и др., 1969, 1974) и для хромосом 1, 13—15 и 16 при сравнении лимфоцитов крови с амниотическими клетками (Gegman, Agopian, 1971). Возможно, определенные расхождения в описании внутрихромосомной хронологии репликации ДНК для одних и тех же хромосом у разных авторов связаны с разным типом исследуемых клеток.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ ДНК В ИЗМЕНЕННЫХ ХРОМОСОМАХ

Вопрос о том, насколько стабилен порядок редупликации участков хромосомы, трудно отрывать от более общего вопроса: стабильности или изменчивости типа структурно-функциональной дифференцированности. К этому сложному вопросу мы вернемся в главе VII. В данной главе мы ограничимся материалами о порядке репликации ДНК в численно и структурно измененных хромосомах человека.

Контроль за порядком репликации ДНК в геноме осуществляется на разных уровнях. Один из этих уровней — надхромосомный, поскольку очевидно, что без подобного контроля была бы недостижима в высшей степени выраженная межхромосомная упорядоченность репродукции. Многие факты свидетельствуют, однако, о том, что существуют и внутрихромосомные механизмы регуляции последовательности синтеза ДНК. Глубоко обоснованные данные о наличии центров и определенного градиента генетической инактивации в X-хромосоме мыши — это наиболее важный из этих фактов. Накапливается все больше соответствующих наблюдений на X-хромосоме человека. Эти наблюдения говорят о принципиальной возможности изменения состояния генетической активности хромосомного участка при определенных условиях. Поэтому оправдан тщательный анализ случаев численных или структурных изменений хромосом в поисках дальнейших наблюдений в этой области. Изучение времени репликации ДНК в хромосомах является при этом главным инструментом анализа.

В подавляющем большинстве радиоавтографически обследованных индивидов с теми или иными численными или структурными отклонениями в хромосомном наборе заметных изменений в порядке репликации аномальных хромосом не описано. Возможно, что такие отклонения могут возникнуть лишь в особых случаях хромосомного дисбаланса. Не исключено, что они возникают чаще, но проходят незамеченными из-за несовершенства методов их обнаружения. Так или иначе, но в идентификации хромосом при хромосомных болезнях отправным пунктом является допущение стабильности порядка редупликации в изменяющихся хромосомах. Ниже мы сошлемся на наиболее важные наблюдения в этой области. Одно-

временно этот материал проиллюстрирует возможности и реальные успехи в применении анализа репликационной структуры для идентификации хромосом при хромосомных болезнях.

Хромосомы 1—3, будучи крупными аутосомами, содержащими, по-видимому, жизненно важные генетические локусы, нечасто обнаруживаются измененными у живорожденных индивидов. Как правило, эти изменения представляют собой сбалансированные реципрокные транслокации. Хромосома 1 может существенно варьировать от индивида к индивиду по размерам поздно редуплицирующегося гетерохроматинового района возле центромеры. Нет никаких свидетельств того, что при этом как-то меняется порядок репликации ДНК в других районах. В медико-цитогенетической практике бывает необходимо отличать обе хромосомы 3 от сходных с ними по размерам и форме изохромосомы X по длинному плечу или D/g транслокаций. Обычно это не представляет затруднений (см. главу VI).

Среди структурных изменений хромосом 4 и 5 чаще всего встречаются делеции дистальных участков коротких плеч (синдромы 4p— и 5p—). В литературе нет указаний на явные репликационные различия нормальных и делетированных В-хромосом. Привлекают внимание, однако, следующие два сообщения. Warburton и сотрудники (1967), изучив 12 пациентов, сообщили, что длинное плечо хромосомы 5, несущей делецию, было короче плеча неделетированного гомолога и нормальной хромосомы контрольных лиц. В пяти случаях синдрома 4p— длинное плечо аномальной хромосомы также было достоверно короче, чем у нормального гомолога (Miller, 1970). Это различие в длинах было подтверждено и дополнительно показано, что в хромосоме 4p— имелось достоверно больше метки, чем в нормальном гомологе (Miller e. a., 1968; Miller, 1970). Отражают ли эти наблюдения истинное смещение времени репродукции в связи с нарушением структурной целостности хромосомы или это проявление асинхронности гомологов остается неизвестным.

Как известно, с жизнеспособностью родившегося индивида совместима полная трисомия лишь одной из трех хромосом группы D, а именно хромосомы 13. Радиоавтографическое обследование хромосом таких больных показывает, что лишняя хромосома не отличается по кар-

тине включения метки от остальных двух хромосом 13 (Giannelli, 1970 и др.). Среди структурных изменений D-хромосом самыми распространенными являются их взаимные или с G-хромосомами транслокации типа центрального слияния. Обширный материал по радиоавтографической характеристике таких транслокаций позволяет заключить, что в порядке редупликации вступающих в транслокации хромосом явных изменений не отмечается. Именно из этого положения исходят исследователи в идентификации хромосом групп D и G, вступающих в транслокации такого типа. Делеции короткого плеча D-хромосом, по-видимому, также не изменяют порядка репродукции остающегося длинного плеча. Сложнее оценить рисунок репликации и тем самым идентифицировать D-хромосомы с частичной делецией длинного плеча, с инверсиями, кольцевые. В этих случаях идентификация обычно проводится на основании «отсутствующей» нормальной хромосомы и отчасти с учетом фенотипических проявлений хромосомного дисбаланса.

Данные литературы по радиоавтографическому изучению хромосом пациентов с измененным числом или структурой хромосом группы E также не содержат каких-либо сведений об изменении характера их репродукции. При синдроме Эдвардса, обусловленном трисомией хромосомы 18, уже в первых работах было показано сходство по рисунку включения метки всех трех хромосом 18 (Geghan, 1964; Yunis e. a., 1964). Возможность идентифицировать хромосому 18 не только по рисунку включения метки обеспечивает хороший контроль над правильностью радиоавтографической идентификации. Метод радиоавтографии помог выделить еще два синдрома, связанные с делецией хромосомы 18: синдром делеции короткого (18p—) и длинного (18q—) плеч (Lugie, Lazjuk, 1972). Как при первом, так и при втором синдромах анализ включения метки, за редким исключением (Giannelli, 1970), проводился не количественно, изменений характера редупликации не отмечалось.

Небольшие размеры хромосом группы G исключают возможность путем анализа метки решать вопрос об изменении картины редупликации при численных или структурных их изменениях. Радиоавтография помогла лишь в идентификации хромосом 21 или 22, вовлекаемых в центрические слияния, и подтвердила принадлежность

линей хромосомы при транслокационной форме трисомии 21 к более поздно метящейся ^3H -тимидином.

Среди изложенных выше материалов мы не приводим сведений по хромосомам групп С и F. Это понятно как по причине сравнительно редкого вовлечения этих хромосом в перестройки, но главным образом из-за невозможности идентификации этих хромосом на основании изучения их редупликации.

X-хромосома. Радиоавтографическое изучение аномалий в системе X-хромосом в сопоставлении с картиной соответствующих клинических изменений внесло наиболее существенный вклад в понимание обсуждаемой проблемы.

При X-полисомиях различного типа все X-хромосомы, кроме одной, оказываются поздно редуплицирующимися. Почти во всех работах задача изучения репродукции хромосом состояла в их разделении на рано и поздно редуплицирующиеся, и эта задача решена однозначно. В какой мере дополнительные X-хромосомы сходны или различны между собой по времени редупликации, этот вопрос по-настоящему не исследовался. У одного из индивидов с карiotипом 49, XXXXX найдена синхронность репликации четырех избыточных X-хромосом (Rowley e. a., 1963). Однако в некоторых других работах обращается внимание на асинхронность их редупликации (Л. И. Барановская, 1973; Ricci e. a., 1968). По наблюдениям авторов последних двух работ, такая асинхронность значительна, и, возможно, отражает истинные различия дополнительных X-хромосом в степени генетической инактивации.

Большой интерес представляют структурные аномалии X-хромосом, которые можно разделить на две группы. Аномалии первой группы затрагивают целостность только X-хромосомы и включают: а) полные делеции короткого плеча с образованием телоцентрической хромосомы — $\text{tel}(Xq)$ или при дупликации плеча изохромосомы — $i(Xq)$; б) частичные делеции длинного плеча — $Xq-$; в) кольцевые X-хромосомы — $r(X)$. Высказаны веские соображения в пользу того, что особи с полной делецией длинного плеча или изохромосомой по короткому плечу нежизнеспособны и что описанные случаи $i(Xp)$ на самом деле являются случаями частичной делеции длинного плеча (Therman, Patau, 1974). Примечательная черта репликационной характеристики хромосом этой

группы состоит в том, что запаздывающей в редупликации, генетически инактивированной является всегда аномальная X-хромосома. Объясняется это не первичной избирательной инактивацией именно измененной хромосомы, а действием отбора в раннем эмбриогенезе, который устраняет клетки с инактивированной нормальной X-хромосомой как генетически несбалансированные.

Вопрос о том, меняется ли характер репликации в хромосомах этой группы, подвергался специальному изучению на примере нескольких случаев изо-X-хромосомы по длинному плечу с применением метода радиоавтографии и нового метода изучения репликации и конденсации участков хромосом с помощью 5-бромдезоксипуридина (В. А. Бениш и др., 1975; Вагановская е. а., 1976). Получены убедительные данные о структурно-функциональной неравнозначности изоплеч этой хромосомы.

Вторую группу X-аномалий составляют транслокации, взаимные или с аутосомами. Тщательный анализ данных литературы и собственных материалов по этим аномалиям и их оригинальную трактовку дают Therman и Patau (1974).

Эта группа включает прежде всего ряд случаев реципрокных сбалансированных X/аутосомных и X/X транслокаций при сохранении общего числа хромосом равным 46. Замечательная особенность репликационной картины измененных хромосом состоит в том, что она различна в разных кариотипах. У 15 из 16 пациентов поздно меченой оказалась не аномальная, а нормальная X-хромосома. В одном из случаев — $t(Xp-; 18q+)$ — 78% клеток имели поздно меченую $Xp-$, 22% — нормальную X-хромосому (Thelen e. a., 1971). Знаменательно то, что в описанных в литературе трех семьях, у большинства членов которых генетически активной была аномальная X-хромосома, у некоторых других эта хромосома оказалась инактивированной. В этих случаях инактивация распространялась на транслоцированный участок аутосомы. Анализ этого материала позволил сделать следующее заключение. Во-первых, в X/аутосомных транслокациях возможна инактивация (гетерохроматизация) аутосомного материала вследствие эффекта положения. Во-вторых, отбор в эмбриогенезе сохраняет такие кариотипы, которые имеют наибольшую генетическую сбалансированность.

Изучение группы пациентов с несбалансированными транслокациями не только подтвердило возможность изменения порядка репликации ДНК в аутомном материале при его переносе на X-хромосому, но и помогло выявить условия такого изменения. Выяснилось, что аутомный материал подвергался изменению, если транслоцировался на короткое плечо инактивированной X-хромосомы. В сочетании с фенотипической характеристикой соответствующих пациентов именно эти материалы позволили выдвинуть гипотезу о существовании в X-хромосоме человека центра генетической инактивации с предположительной его локализацией в проксимальной части длинного плеча (Therman e. a., 1974; Therman, Patau, 1974).

Y-хромосома. Ряд работ, выполненных на индивидах 47, XYU и 48, XXUU, не дали однозначных результатов по сравнительной репликационной характеристике Y-хромосом при их полисомии. У одних индивидов заметных различий между обеими Y-хромосомами не отмечалось, для других отмечена четкая асинхронность. Nielsen с сотр. (1970), обследовав радиоавтографически 8 пациентов с двумя Y-хромосомами, у каждого из них наблюдали в разных метафазах как синхронное, так и асинхронное включение метки в эти хромосомы. Эти данные заставляют с осторожностью интерпретировать различия в интенсивности включения метки в две Y-хромосомы как показатель истинных различий в их функциональном состоянии.

При малых размерах этих хромосом определенные различия в количестве зерен могут находиться в границах случайных различий, допускаемых самим методом учета радиоактивного излучения.

Выше уже говорилось о значительном полиморфизме Y-хромосомы по размерам длинного плеча. Изучение репликации ДНК показало, что увеличенные плечи остаются поздними по времени редупликации. По-видимому, Y-хромосома остается поздно редуплицирующей и при других структурных ее перестройках. Изо-Y-хромосомы по длинному плечу или дицентрические хромосомы с сохранением длинного плеча метятся как нормальные хромосомы и симметрично в обоих плечах (Giannelli, 1970).

ИЗУЧЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ДНК С ПРИМЕНЕНИЕМ 5-БРОМДЕЗОКСИУРИДИНА

При регистрации распределения 5-бромдезоксиуридина в хромосомах во втором клеточном цикле после его включения в первом и втором была обнаружена ослабленная конденсация и окраска хроматиды, включившей аналог в обе нити молекулы ДНК (Zakharov, Egoлина, 1972). При воспроизведении этих опытов на хромосомах человека с использованием окраски флуорохромами — акридиновым оранжевым (Dutrillaux e. a., 1973) или Хехст (Hoechst) 33258 (Latt, 1973) — на участках хромосомы, включивших 5-бромдезоксиуридин, в одном цикле, было отмечено ослабленное свечение. Так возникла идея использовать способность 5-бромдезоксиуридина, включенного в хромосому, ослаблять флуоресценцию красителя для описания последовательности репликации ДНК в хромосоме (Latt, 1973). Разрешающая способность метода повышается в модификации Реггу и Wolff (1974), которая состоит в том, что после окраски флуорохромом Хехст 33258 препарат окрашивается по Гимзе и исследуется под обычным, а не люминесцентным микроскопом.

Для анализа хронологии редупликации хромосом человека эта модификация была впервые применена в следующем варианте (Н. А. Еголина, А. Ф. Захаров, 1976; Zakharov, Egoлина, 1976).

В работе использовали культуры лимфоцитов периферической крови человека. 5-Бромдезоксиуридин вводили в культуры вместе с 5-фтордезоксиуридином и уридином в концентрациях, соответственно 20 мкг/мл, 0,1 мкг/мл и 2 мкг/мл. Была исследована последовательность репликации ДНК как в первой половине S-периода (введение 5-бромдезоксиуридина на 1½—2 ч за 10—12 ч до фиксации), так и во второй его половине (введение аналога за 3—5 ч до фиксации). Окраску препаратов сначала проводили в растворе флуорохрома Хехст 33258 (0,5 мкг/мл) в течение 15 мин, затем препараты выдерживали несколько часов на свету заключенными в физиологический раствор под покровное стекло. После ополаскивания дистиллированной водой препараты окрашивали 2% раствором красителя Гимзы (рН 5,2).

Обработанные указанным способом препараты содержат метафазы с ясной картиной неравномерного ок-

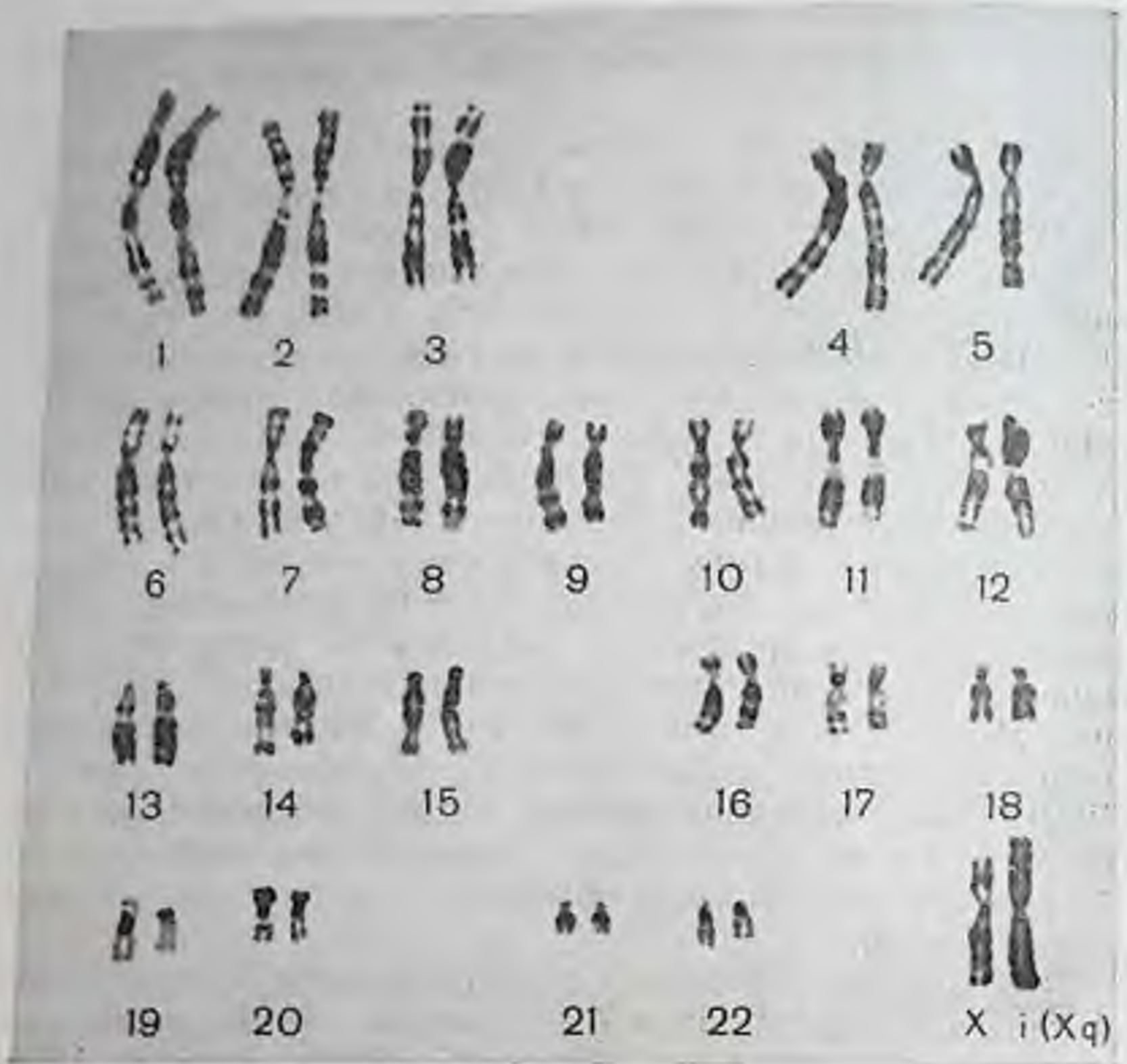


Рис. 19. Репликационная структура хромосом человека (46, X, i(Xq), устанавливаемая по включению 5-бромдезоксинуридина на начальных этапах S-периода. Неокрашенные или слабо окрашенные сегменты соответствуют районам ранней репликации ДНК.

рашивания хромосом по длине. Разные метафазы имеют разную картину такой продольной дифференцированности, что находится в полном согласии с природой окрашивания: его неравномерность определяется включением 5-бромдезоксинуридина в разные участки хромосомы, что в свою очередь варьирует от клетки к клетке из-за асинхронности их продвижения по циклу. На рис. 19 и 20 представлены картины включения аналога тимидина в начальный и конечный отрезки S-периода, особенно богатые деталями дифференцированности. Отметим сразу, что сравнение этих картин, как и следовало ожидать, показывает их хорошее совпадение по числу, размерам

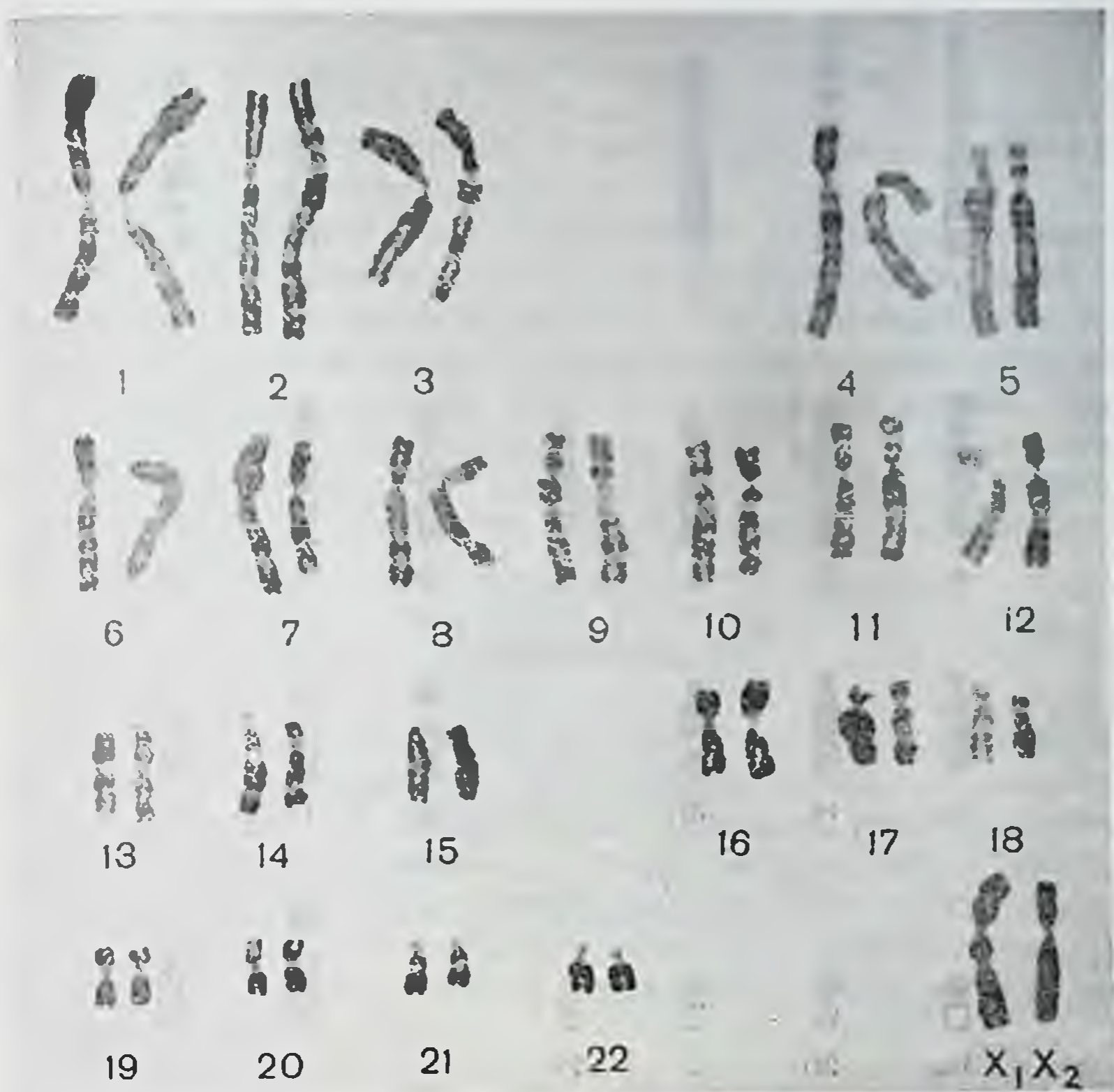


Рис. 20. Репликационная структура хромосом человека (46, XX), устанавливаемая по включению 5-бромдезоксимуридина на конечных этапах S-периода. Неокрашенные или слабо окрашенные сегменты соответствуют районам поздней репликации ДНК.

и положению сегментов, разница лишь в том, что одинаковые сегменты окрашены противоположно. Метафазы более ранних или более поздних этапов синтеза по сравнению с представленными на рисунках имеют меньшее число сегментов, включающих 5-бромдезоксимуридин, и меньшие их размеры. К середине S-периода, наоборот, в синтезе участвует подавляющее большинство районов, и такие хромосомы окрашиваются слабо и довольно гомогенно по всей длине. Анализ большого числа метафаз позволяет дать следующую общую характеристику репликационной структуры нормальных хромосом человека.

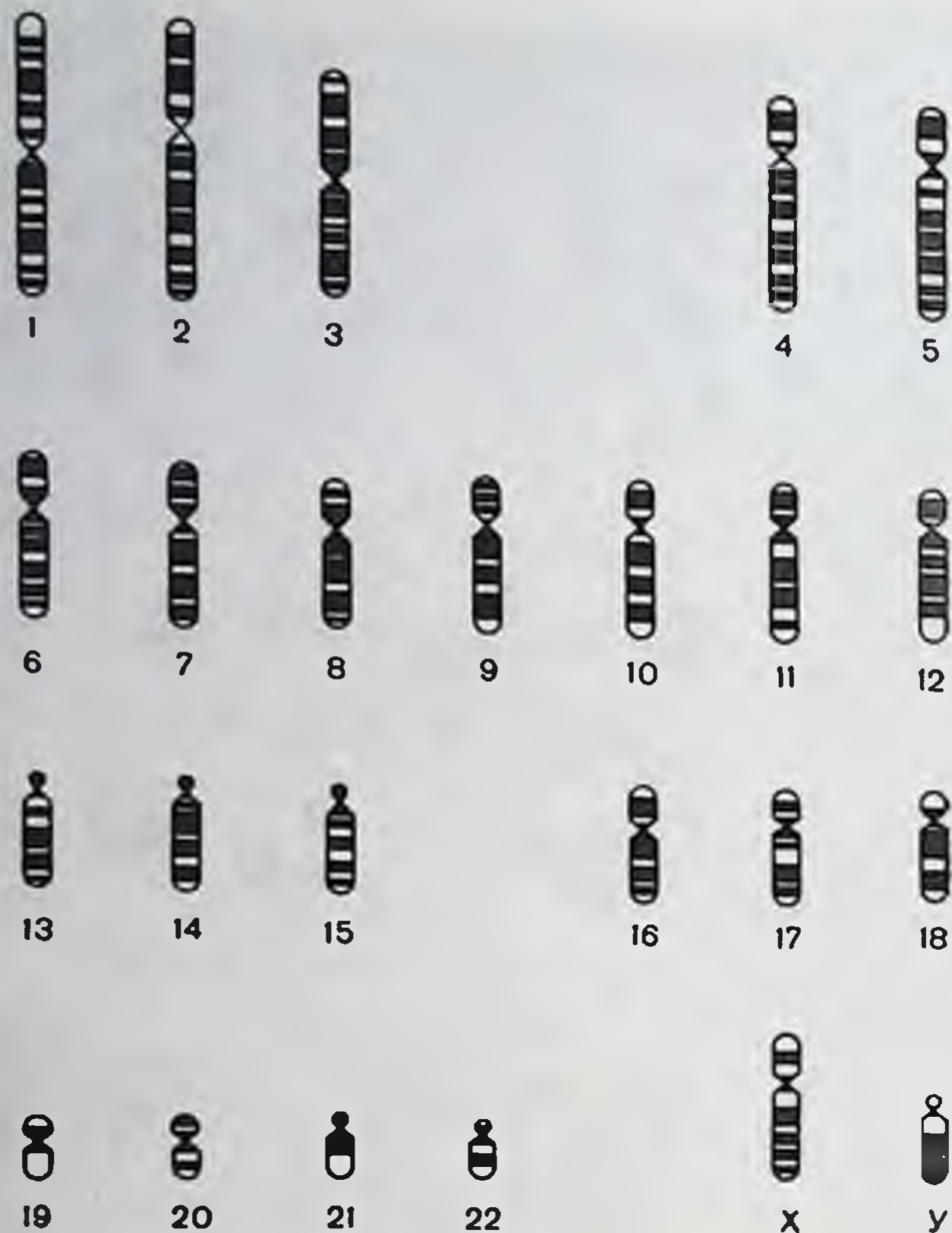


Рис. 21. Схема репликационной структуры хромосом человека. Черные и светлые сегменты соответствуют участкам поздней и ранней репликации ДНК соответственно.

Все хромосомы человека представляют собой структуры, дифференцированные линейно на многие участки с разным временем репликации ДНК (рис. 21). Как правило, размеры этих участков небольшие. Каждая хромосома отличается своим специфическим рисунком распределения ранних и поздних по времени репликации ДНК районов, причем обычно нет резкой границы между ними. Самые крупные ранние по времени репликации ДНК участки имеются в виде интерстициальных сегментов в длинных плечах хромосом 1, 5, 11, 12, 14, 15, 17, в коротком плече хромосомы 6. Среди достаточно крупных запаздывающих в синтезе сегментов находятся околоцентромерные районы хромосом 1, 3, 9, 16, 21, интерстициальные участки в хромосомах 4, 5, 7, 8, 11 и 13. Следу-

ет отметить, что описываемым методом удалось установить позднее время редупликации околоцентромерных районов всех хромосом, хотя на вопрос о том, являются ли они наиболее поздними в окончании синтеза районами хромосом, ответить пока трудно.

Индивидуальная репликационная структура каждой хромосомы настолько четка, что не нуждается здесь в словесном описании (см. рис. 19—21). Дальнейшей задачей исследований является описание динамики последовательности репликации ДНК в каждой хромосоме. Высокая разрешающая способность метода позволила получить первые сведения об изменчивости порядка репликации ДНК в структурно перестроенных X-хромосомах (Вагановская е. а., 1976).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение в цитогенетику радиоавтографического метода анализа хронологии репликации ДНК обеспечило изучение линейной организации хромосом человека важнейшим функциональным тестом. Важно подчеркнуть, что внутрихромосомная последовательность репликации ДНК, хотя и с недостаточной степенью разрешения, обнаружена и исследована с помощью этого метода на метафазных хромосомах.

Репликационная структура каждой хромосомы человека, в полном согласии с тем, что известно для хромосомы эукариотов в целом, оказывается глубоко дифференцированной, специфичной для каждой индивидуальной хромосомы и, по-видимому, стабильной для данного типа клеток. В хромосомном наборе человека нет элементов, время репродукции которых было бы целиком сдвинуто в раннюю или позднюю половину синтетического периода цикла. Продолжительность репродукции каждой хромосомы, включая половые, измеряется рядом часов. Это говорит о том, что каждая хромосома представляет собой гетерогенную репликационную структуру, репликоны которой в определенном порядке функционируют на протяжении большого промежутка времени. В пределах индивидуальных хромосом, таких, как 1, 3, 4, 9, 13, 16, 18, X и Y, метод радиоавтографии обнаруживает участки относительно синхронно репродуцирующихся репликонов, которые проходят репликацию в конце синтетического периода. Можно заключить, что большинство хро-

мосом на большей части своей длины дифференцированы на сравнительно небольшого размера участки, различающиеся временем репликации ДНК. Точное описание расположения в хромосомах таких участков с помощью меченых предшественников и радиоавтографии оказывается невозможным из-за недостаточной разрешающей способности этого метода. По этой же причине остаются слабо изученными два важных вопроса, получение ответов на которые имело бы существенное значение для понимания механизмов внутриклеточного контроля за порядком репродукции участков хромосомы и хромосомного набора в целом. Первый из них — имеются ли различия в порядке редупликации хромосом и их участков в разно дифференцированных клетках. Обнаружение таких различий означало бы, что в репликационной структуре отражается линейная дифференцированность хромосомы по генетической активности и что такая дифференцированность проявляется даже на уровне крупных районов хромосомы. Второй вопрос касается стабильности порядка редупликации в хромосомах, возможности его изменения под влиянием тех или иных условий, в частности, при изменении хромосомного баланса клетки, при структурной перестройке данной хромосомы.

В настоящее время изучение последовательности репликации ДНК в хромосомах становится возможным без применения меченых ее предшественников, без радиоавтографии. Новый метод состоит в определении хромосомных участков, включивших в ДНК 5-бромдезоксинуридин, по их ослабленной окрашиваемости. Полученные с помощью этого метода предварительные результаты говорят о его высокой разрешающей способности: обеспечивается возможность получить в последовательных морфологических картинах неравномерного окрашивания хромосом точное представление о репликационной структуре хромосомы на разных временных отрезках синтетического периода клеточного цикла. Использование нового метода должно значительно облегчить получение ответов на поставленные выше вопросы.

ХИМИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТЬ ХРОМОСОМ

ВВЕДЕНИЕ

Первые сведения о том, что ДНК с многократно повторяющимися последовательностями распределена в геноме млекопитающих неравномерно, были получены при равновесном центрифугировании ДНК, выделенной отдельно из эухроматина и гетерохроматина. Такие исследования, проведенные на клеточных ядрах мыши и других млекопитающих, обнаружили значительную обогащенность гетерохроматина сателлитной ДНК — одним из видов ДНК с многократно повторяющимися последовательностями. Основная информация по хромосомному распределению различающихся фракций ДНК получена с помощью метода гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, т. е. на фиксированных хромосомах цитологических препаратов. Некоторые сведения получены также на основе изучения: а) включения в хромосомы меченых предшественников АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК, б) интенсивности свечения флуорохромов, по-разному взаимодействующих с разными парами оснований, в) распределения в хромосомах антисывороток, специфичных к разным основаниям.

Метод гибридизации *in situ*

Метод является логическим развитием того варианта техники молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, при котором одна из них, а именно ДНК, находится не в растворе, а фиксирована на твердом субстрате. Счастливая идея использовать в качестве источника ДНК и одновременно твердого ее носителя фиксированные хромосомы была осуществлена одновременно двумя группами исследователей (Gall, Pardue, 1969; John e. a., 1969). Место гибридизации, которое соответствует лока-

лизации повторяющихся последовательностей, комплементарных использованной в качестве их индикатора меченой РНК, определяется радиоавтографически.

Ключевым моментом успешного картирования хромосом с помощью этого метода является наличие в руках исследователя РНК, комплементарной классу ДНК, локализацию которого в хромосоме требуется найти. Метод по заложенной в нем сути открывает локализацию повторяющихся копий последовательностей. Естественными РНК, легко выделяющимися из клеток и состоящими из повторяющихся последовательностей, являются прежде всего рибосомные РНК (28S, 18S, 5S). Возможно определение локализации цистронов, кодирующих каждую из них. Препаративному выделению доступны также транспортные РНК и РНК, определяющие синтез гистонов, полимерность соответствующих генов позволяет использовать метод гибридизации *in situ* для их картирования. Указанными генами, составляющими около 0,5% всей ДНК, пока и исчерпывается круг тех классов ДНК, функциональное значение которых известно, а транскрибируемые с них РНК могут быть выделены как нативные продукты клетки. РНК, комплементарные другим семействам повторяющихся последовательностей, могут быть получены искусственным синтезом в РНК-полимеразной системе, включающей в качестве ДНК-матрицы ту ее фракцию, локализацию которой нужно определить. Очевидно, успех в картировании хромосом по разным классам ДНК в немалой степени зависит от успешного фракционирования ДНК и выделения фракций по возможности в чистом виде.

В настоящее время существуют два основных методических подхода к фракционированию ДНК в этих целях (Bostock, 1971; Flamm, 1972). Один из них — равновесное центрифугирование ДНК в градиенте плотности тяжелых солей, обычно хлорида или сульфата цезия. При продолжительном ультрацентрифугировании в таких растворах создается градиент плотности соли, который может быть описан спектром ее концентраций (в г/см³)*. Макромолекулы ДНК в таком градиенте распределяются соответственно их плавучей плотности. Последняя зависит прежде всего от усредненного состава азотистых оснований молекулы и с увеличением пропорции пар Г—Ц

* По системе СИ плотность выражается в 10³ кг/м³.

нарастает. В итоге распределение нативной ДНК в градиенте отражает нуклеотидный состав молекул, и чем ДНК гетерогеннее по этому составу, тем шире зона ее распределения. Если часть ДНК заметно отличается по составу оснований от основной ДНК генома и существует в нем в виде самостоятельных и повторяющихся молекул, такая ДНК образует в градиенте плотности солей цезия отдельную минорную полосу (пик). Названная сателлитной, эта ДНК может быть легче или тяжелее основной ДНК, она относится к ДНК с особенно высокой частотой повторяющихся последовательностей и обладает высокой скоростью ренатурации. При препаративном центрифугировании такие ДНК могут быть выделены как самостоятельные фракции. Плавающая плотность зависит также от нативности ДНК, которая является более высокой у денатурированной ДНК.

ДНК с многократно повторяющимися последовательностями может не отличаться или слабо отличаться по составу оснований от основной, скрываясь в градиенте плотности хлорида цезия в зоне основного пика. «Скрытая» сателлитная ДНК может быть обнаружена с помощью дополнительных приемов. ДНК с разным составом оснований по-разному связывается с Ag^+ или Hg^{2+} . Поэтому центрифугирование в градиенте плотности сульфата цезия с дополнительным введением ионов серебра или ртути благодаря повышению плавающей плотности тех или иных семейств позволяет выделить их в виде сателлитов. Этот прием впервые был применен для выделения сателлитных ДНК именно человека. Другой прием состоит в предварительной денатурации всей ДНК с последующей частичной ренатурацией, которая произойдет в семействах с наибольшим количеством копий. В градиенте плотности хлорида цезия такая ДНК может быть отделена от остальной благодаря большой плавающей плотности неренатурированной ДНК. Следующий прием состоит в применении градиентного центрифугирования не в нейтральном, а в щелочном растворе хлорида цезия. В щелочной среде происходит разделение элементарных нитей ДНК. Так как нередко сателлитные ДНК имеют асимметрию этих нитей по нуклеотидному составу, в щелочном градиенте такие нити могут образовывать самостоятельные полосы.

Разрешающая способность градиентного центрифугирования может быть значительно повышена, если цент-

рифугированию подвергают не тотальную ДНК генома, а ее фракции, полученные тем или иным способом (фракционирование на гидроксилapatите и др.).

Второй методический подход, применяющийся самостоятельно или в комбинации с первым, состоит в разделении тотальной ДНК на фракции, которые различаются по скорости ренатурации, что как раз и отражает различие их по повторяемости нуклеотидных последовательностей. ДНК, предварительно фрагментированная, подвергается денатурации. Для отделения ренатурированной ДНК от остальной ее пропускают через колонки с гидроксилapatитом при определенных режимах температуры и концентрации ДНК. Однонитчатая ДНК проходит через гидроксилapatит, двунитчатая (ренатурированная) связывается с ним и может быть затем отделена для использования в опытах гибридизации.

Ключевой процедурой этого метода является получение фракций, строго охарактеризованных по степени повторяемости последовательностей. Поскольку последняя при прочих равных условиях является главным фактором скорости реассоциации, мерой повторяемости служит скорость ренатурации. Для ее измерения используется показатель Cot , где C_0 — исходная концентрация ДНК, а t — время в секундах (Britten, Coppe, 1968). Этот показатель учитывает, следовательно, оба фактора, влияющие на скорость ренатурации молекул ДНК: их концентрацию и время. Чем меньше значение Cot , при котором с помощью гидроксилapatита получена фракция, тем большей многократностью копий последовательностей она обладает. По значению Cot выделяют следующие группы фракций ДНК: а) с очень высокой повторяемостью последовательностей ($Cot 10^{-4}$ — 10^{-1}), б) со средней (промежуточной) повторяемостью ($Cot 10^0$ — 10^2), в) с небольшой повторяемостью или уникальная ДНК (Cot выше 10^2).

Фракции, полученные указанным методом, в дальнейшем могут быть подвергнуты анализу и субфракционированию с помощью градиентного центрифугирования. Для фракционирования ДНК человека использованы все упомянутые методические подходы.

Процедура гибридизации *in situ* как таковая состоит в последовательном проведении: а) денатурации ДНК хромосомных препаратов нагреванием или щелочью, б) инкубации препаратов с меченой РНК, в) удаления

из препаратов РНК, не вступившей в гибридизацию, г) экспонирования препарата под эмульсией. Критическим моментом метода является применение РНК, которая должна иметь высокую удельную радиоактивность. Третий в таких экспериментах все более вытесняется ^{125}I , который обеспечивает большую чувствительность метода при меньшем времени экспозиции препаратов под эмульсией.

Другие методы

Существование семейств ДНК с отличным от основной ДНК составом оснований и возможность расположения таких семейств кластерами вызвали попытки применить к их обнаружению методы, посредством которых можно различать ДНК с разным нуклеотидным составом. Соответствующие работы пока не вышли за рамки поисковых, но дают основание рассчитывать на успех.

Метод радиоавтографического изучения включения ^3H -тимидина как предшественника АТ-пар оснований и ^3H -дезоксцитидина как предшественника ГЦ-пар исходит из предположения, что участки хромосом с разным содержанием тех и других оснований будут неодинаково включать тот и другой меченые нуклеозиды. Надежность метода должна быть еще доказана, так как: а) дезоксицитидин не является предшественником только цитозина, б) не известно, одинаковы ли условия утилизации экзогенного тимидина и дезоксицитидина (скорость фосфорилирования, пул нуклеозидфосфатов, относительная доля эндогенных источников предшественников).

Флуорохромный метод, основанный на разном свечении флуорохромированных ДНК в зависимости от состава оснований, включает использование акрихина (Weisblum, Haseh, 1972; Selander e. a., 1973), производных бензимидазола (Weisblum, Haseh, 1974) и профлавина (Distèche, Bontemps, 1974). В модельных экспериментах с чистыми препаратами ДНК, в том числе синтетическими полинуклеотидами известного состава, обнаружено активное свечение содержащей А—Т ДНК и его гашение при взаимодействии флуорохрома с содержащими Г—Ц участками молекулы. Однако прямой перенос результатов этих исследований на ДНК в составе хромосомы был бы ошибкой. Ряд фактов позволяет утверждать, что в составе хромосомы ДНК по отношению к флуоро-

ХАРАКТЕРИСТИКА САТЕЛЛИТНЫХ ДНК

Наименование фракций	% генома	Источник выделения	Главная фракция	Плавучая плотность			
				сателлиты			разделенные нити
				нативный	денатуриро- ванный	ренатуриро- ванный	
Сателлит I	1	Костный мозг, лимфатические узлы, лейкоциты, клетки HeLa	1,700	1,687	1,704	1,694	1,707 1,738
Легкий сателлит	0,2	Клетки HeLa, диплоидные культуры клеток, плацента, селезенка, печень	1,698	1,686	—	—	1,731 1,764
Сателлит II	2	Плацента	1,700	1,693	1,704	1,696	1,740 1,750
Сателлит III	1,5	Плацента	1,700	1,696	1,715	1,703	1,740 1,751

Температура плавления	Повышенное содержание		Условия ренатурации	Метод выделения
	гетерохроматин	ядрышковый материал		
80°C в SSC	Да	—	—	<ol style="list-style-type: none"> 1. 25 мкг/мл в CsCl 2. Hg²⁺, Cs₂SO₄, 50 мкг/мл, R_F = 0,1 3. Ag⁺, Cs₂SO₄, 70 мкг/мл, R_F = 0,2 4. МАК-элюция Ag⁺, Cs₂SO₄, 60 мкг/мл, R_F = 0,23
—	—	Да	—	<ol style="list-style-type: none"> 1. 15 мкг/мл в CsCl 2. Препарат ядрышкового материала
85°C в SSC	Да	—	10 мкг/мл 5 ч при 65°C в 2× SSC Cot 5,6 × 10 ⁻¹ дает 73% денатурации	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ag⁺, Cs₂SO₄, 50 мкг/мл, R_F = 0,27 2. Ag⁺, Cs₂SO₄, 70 мкг/мл, R_F = 0,20 3. МАК-элюция, Ag⁺, Cs₂SO₄, 60 мкг/мл R_F = 0,23
84°C в SSC	Да	—	10 мкг/мл при 60°C в 2× SSC Cot 5,6 × 10 ⁻¹ дает 63% ренатурации	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ag⁺, Cs₂SO₄, 70 мкг/мл, R_F = 0,20 2. МАК-элюция, Ag⁺, Cs₂SO₄, 60 мкг/мл, R_F = 0,23

Наименование фракций	% генома	Источник выделения	Главная фракция	Плавучая плотность			
				спутники			разделенные шти
				нативный	денатурированный	ренатурированный	
Сателлит IV	2	Плацента	1,700	1,700	1,716	1,705	1,730 1,742
Гомогенная часть главной фракции	15	Плацента	1,700	1,696	1,715	1,709	—
Тяжелый сателлит (а)	—	Клетки HeLa	1,698	1,712	1,774	1,774	—
Тяжелый сателлит (б)	—	Лейкоциты (хронич. лимфолейкоз)	1,697	1,703	—	—	—

хромому нередко ведет себя не в полном соответствии с составом ее оснований (см. с. 170 главы VII). Тем не менее для ориентировочной оценки и в сочетании с другими методами флуорохромы могут быть использованы как инструмент оценки нуклеотидного состава хромосомных участков.

Иммунохимический метод включает обработку хромосомных препаратов с предварительно денатурированной ДНК антителами к тем или иным нуклеотидам. Благодаря флуорохромированию антител места локализации соответствующих нуклеозидов узнаются по флуоресценции. Метод, весьма интересный по заложенной в нем

Температура плавления	Повышенное содержание		Условия ренатурации	Метод выделения
	гетерохроматин	ядрышковый материал		
—	—	—	5 мкг/мл × 2 ч при 60°C в 2 × SSC Cot $1,1 \times 10^{-1}$ дает 63% ренатурации	1. МАК-элюция, Ag ⁺ , Cs ₂ SO ₄ , 60 мкг/мл, R _F = 0,23
87°C в SSC	—	—	10 мкг/мл × 5 ч при 65°C в 2 × SSC Cot $5,6 \times 10^{-1}$ дает 58% ренатурации	1. Hg ²⁺ , Cs ₂ SO ₄ , 50 мкг/мл, R _F = 0,1 2. Ag ⁺ , Cs ₂ SO ₄ , 70 мкг/мл, R _F = 0,20
—	—	Да		Препараты ядрышкового материала из HeLa в CsCl, 1, мкг/мл
—	—	—	72,9°C в 0,025 M HCl pH 8,0	Ag ⁺ , Cs ₂ SO ₄ , R _F = 0,27

идее, также не является безоговорочным. Немногочисленный пока опыт показывает, что при применении на фиксированных хромосомах встречается ряд трудно объяснимых, иногда противоречивых явлений, если исходить из идеи метода. Иммунологический подход, как и оба предыдущих, требует дополнительных обоснований.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ДНК

Гетерогенность ДНК генома человека установлена на основе обоих описанных выше методических подходов.

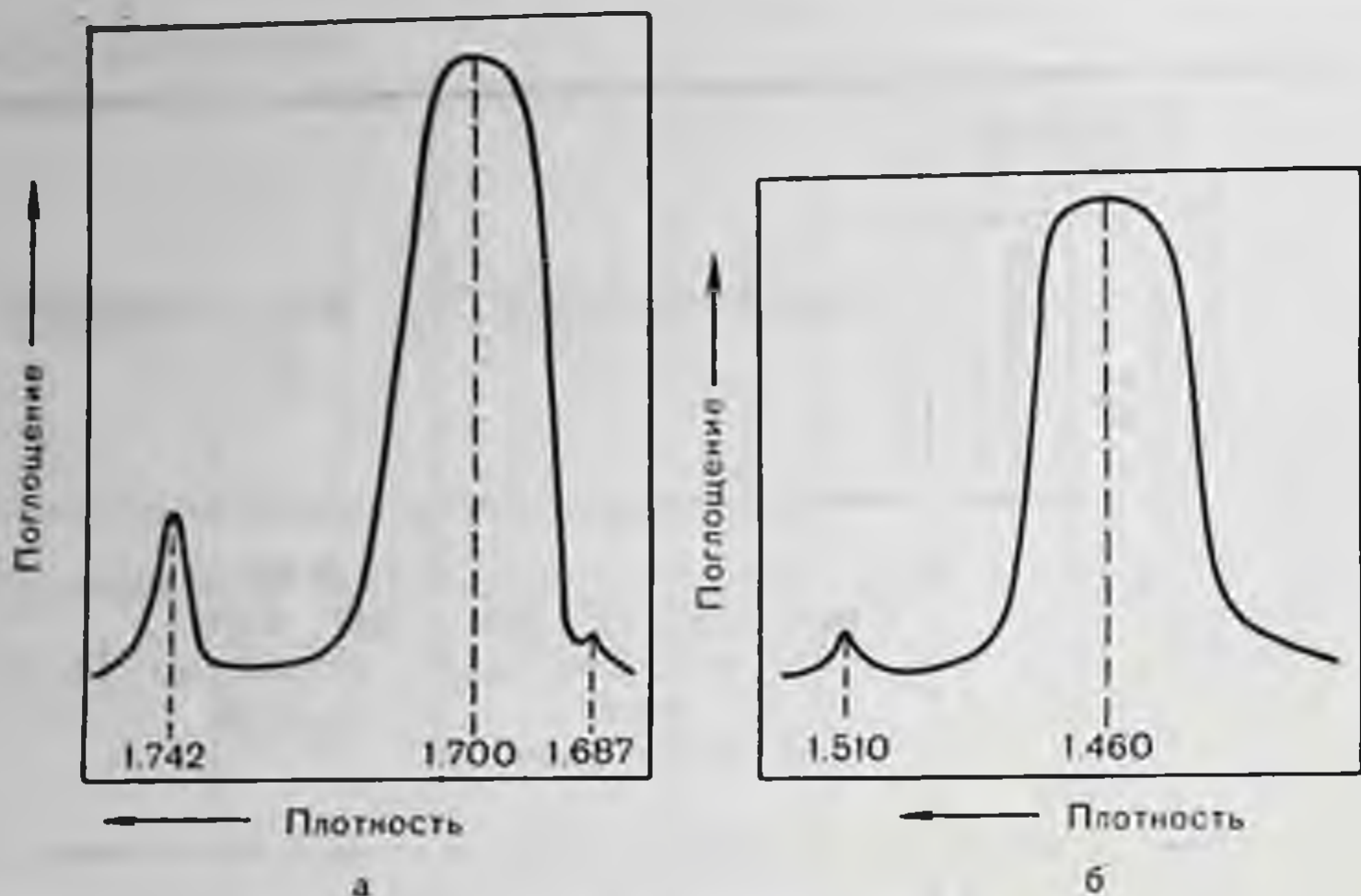


Рис. 22. Равновесное аналитическое центрифугирование:

а — в градиенте плотности CsCl ДНК из костного мозга человека. Малый пик в правой части кривой соответствует сателлитной ДНК I. Пик с плавучей плотностью 1,742 г/см³ — ДНК фага 2С *V. subtilis*; б — в градиенте плотности Hg²⁺, Cs₂SO₄ ДНК из лимфатических узлов человека. Пик с плавучей плотностью 1,510 г/см³ соответствует сателлитной ДНК I (Coppo e. a., 1967).

Методом равновесного центрифугирования в ДНК человека открыто несколько сателлитных ДНК, из которых не все достаточно полно охарактеризованы. Основные сведения по изучению сателлитных ДНК со ссылками на соответствующие работы представлены в таблице 1.

При центрифугировании ДНК в градиенте плотности нейтрального CsCl обнаруживается два пика: основная ДНК с плотностью 1,700 г/см³ и сателлитная ДНК I с плотностью 1,687 г/см³ (Coppo e. a., 1967, 1968) (рис. 22, а). В градиенте плотности Hg²⁺, Cs₂SO₄ пик сателлита I обособляется более резко, что позволило выделить его препаративно (около 0,5% всей ДНК генома). В этом градиенте сателлит имеет плотность 1,510 г/см (рис. 22), что говорит о повышенном содержании в нем А Т-пар оснований. В щелочном градиенте плотности CsCl сателлит I денатурирует с формированием двух полос с плавучей плотностью 1,707 г/см³ и 1,738 г/см³ (табл. 1). Еще одна характерная черта сателлита I — быстрая ренатурация после тепловой или щелочной денатурации (рис. 23). Это позволяет отнести са-

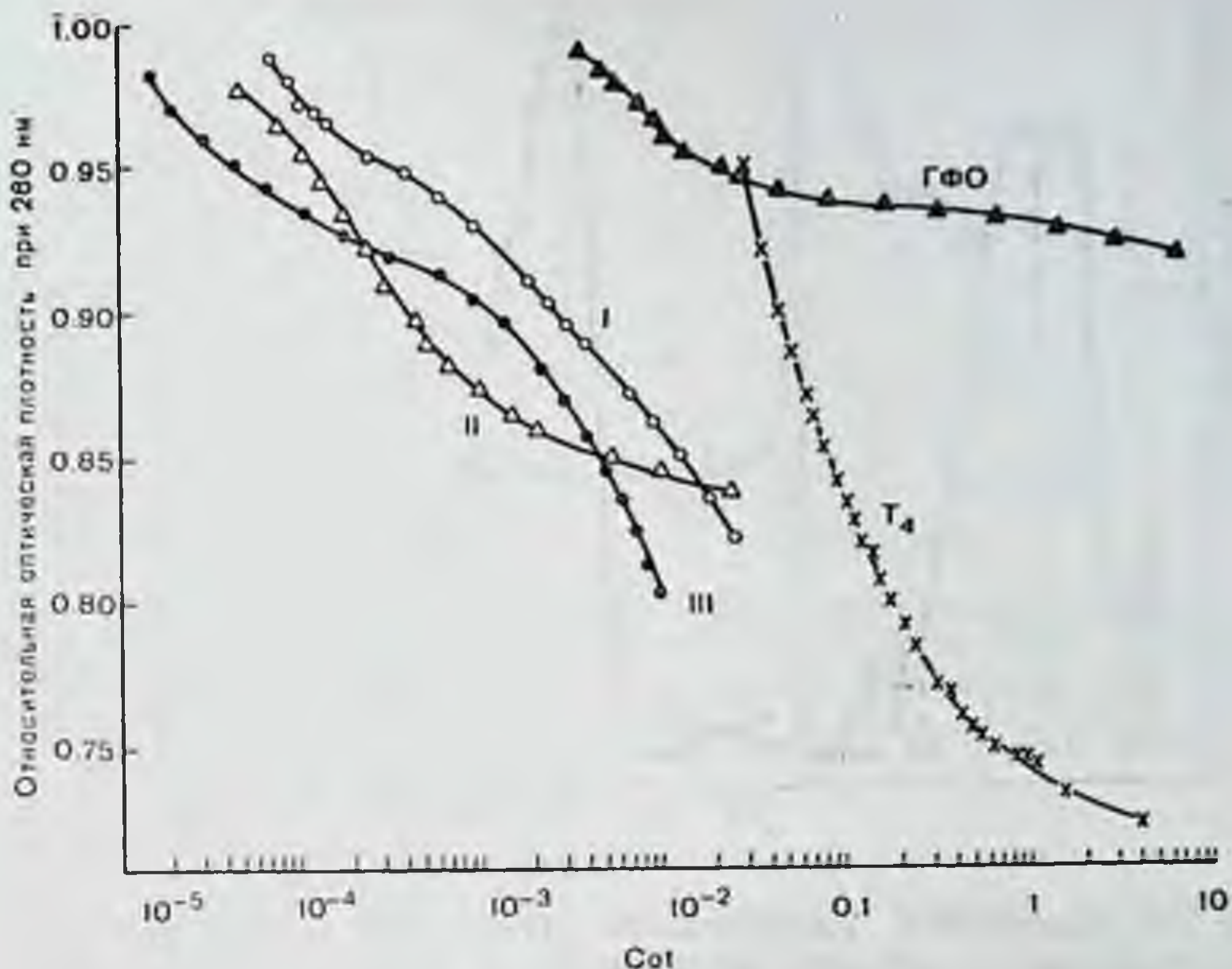


Рис. 23. Кривые кинетики ренатурации сателлитных ДНК человека (I-III) и так называемой гомогенной фракции основной ДНК (ГФО). Кривая ренатурации ДНК фага T₄ дана в качестве маркера. Ось ординат: величина оптической плотности при +60°C относительно плотности при +98°C. Ось абсцисс: значения Cot. Сателлитные ДНК ренатурировали при концентрации NaCl 0,04 М, ДНК фага T₄ — при концентрации NaCl 0,18 М. Все кривые нормализованы в расчете на скорость ренатурации в 0,18 М NaCl (Coppo e. a., 1973).

теллит к классу ДНК с многократно повторяющимися последовательностями.

Результаты центрифугирования ДНК в градиенте плотности сульфата цезия с добавлением серебра или ртути позволили прийти к заключению о высокой гетерогенности основной ДНК и выделить сателлиты II, III и IV.

В градиенте плотности Hg²⁺, Cs₂SO₄ 80% ДНК генома выглядит в виде широкого пика, демонстрируя тем самым высокую гетерогенность молекул по составу оснований (рис. 24). Выделенная препаративно, такая ДНК в градиенте нейтрального CsCl имеет плотность от 1,690 до 1,720 г/см³. Эта ДНК практически не ренатурирует. Приблизительно 15% всей ДНК более гомогенна, причем она имеет плотность в нейтральном CsCl 1,696 г/см³

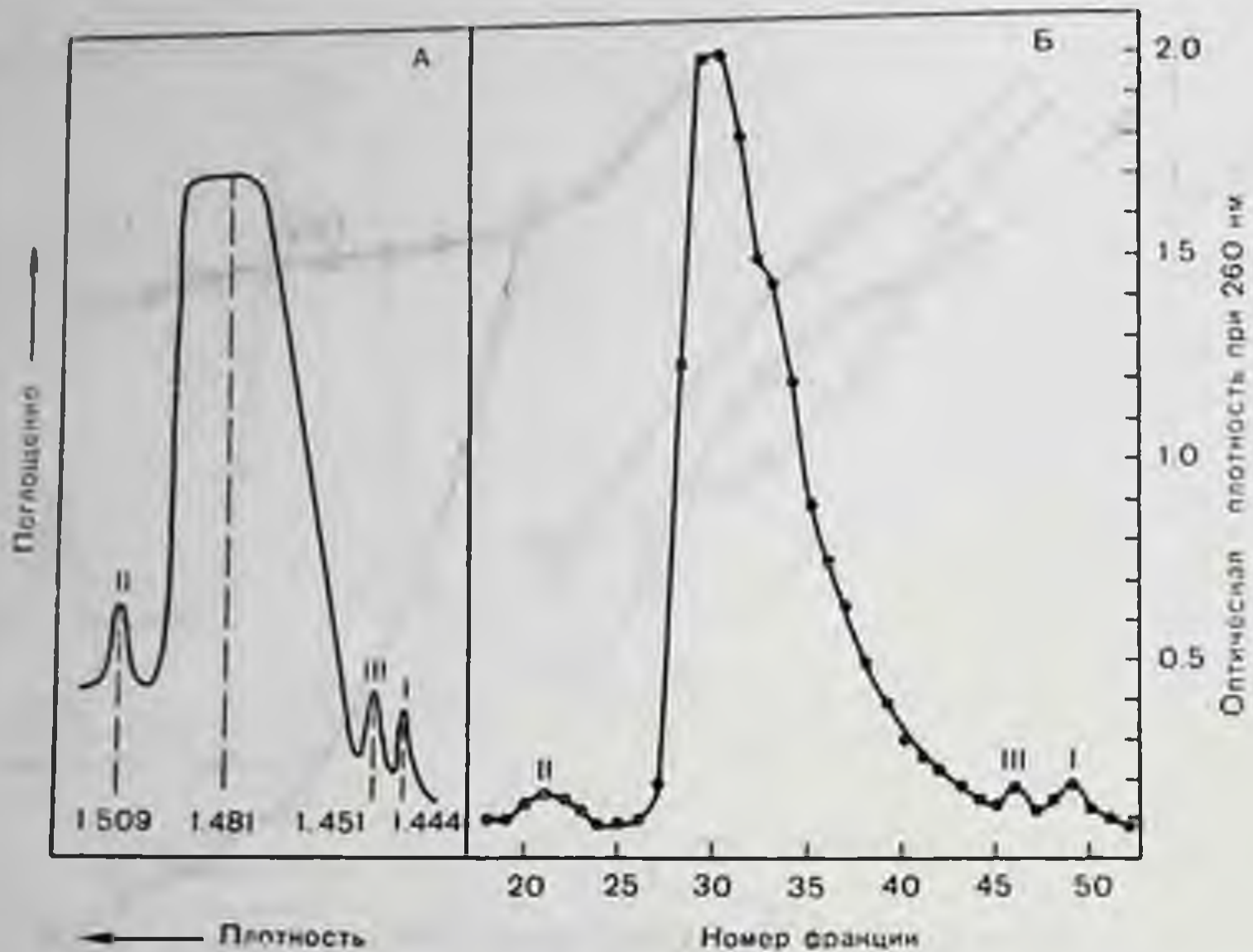


Рис. 24. Равновесное аналитическое (А) и препаративное (Б) центрифугирование общей ДНК из плаценты человека в градиенте плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 . В обоих случаях малый пик в левой части кривой соответствует сателлитной ДНК II, два малых пика справа — сателлитным ДНК I и III, большой пик — основной ДНК (Согнео е. а., 1971).

и располагается в области кривой с меньшей плотностью при центрифугировании в градиенте плотности Cs_2SO_4 с добавлением ионов Ag или Hg (рис. 25). По скорости ренатурации эта «гомогенная» ДНК основного пика обладает некоторыми свойствами ДНК с малой и промежуточной скоростями ренатурации. В этом же градиенте четко выделяется пик в области кривой с большей плотностью, названный *сателлитом II* (рис. 24 и 25). Выделенный препаративно, этот сателлит составляет 2% всей ДНК генома и имеет в нейтральном CsCl плотность $1,693 \text{ г/см}^3$. Сателлит II легко ренатурирует и в градиенте щелочного CsCl разделяется на комплементарные нити различной плотности (см. табл. 1).

Сателлитная ДНК III не образует самостоятельного пика в градиенте плотности Hg^{2+} , Cs_2SO_4 , по-видимому, поглощаясь «гомогенной» фракцией основной ДНК. В градиенте плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 этот сателлит обособляется (см. рис. 24), составляет около 1,5% ДНК и в ней-

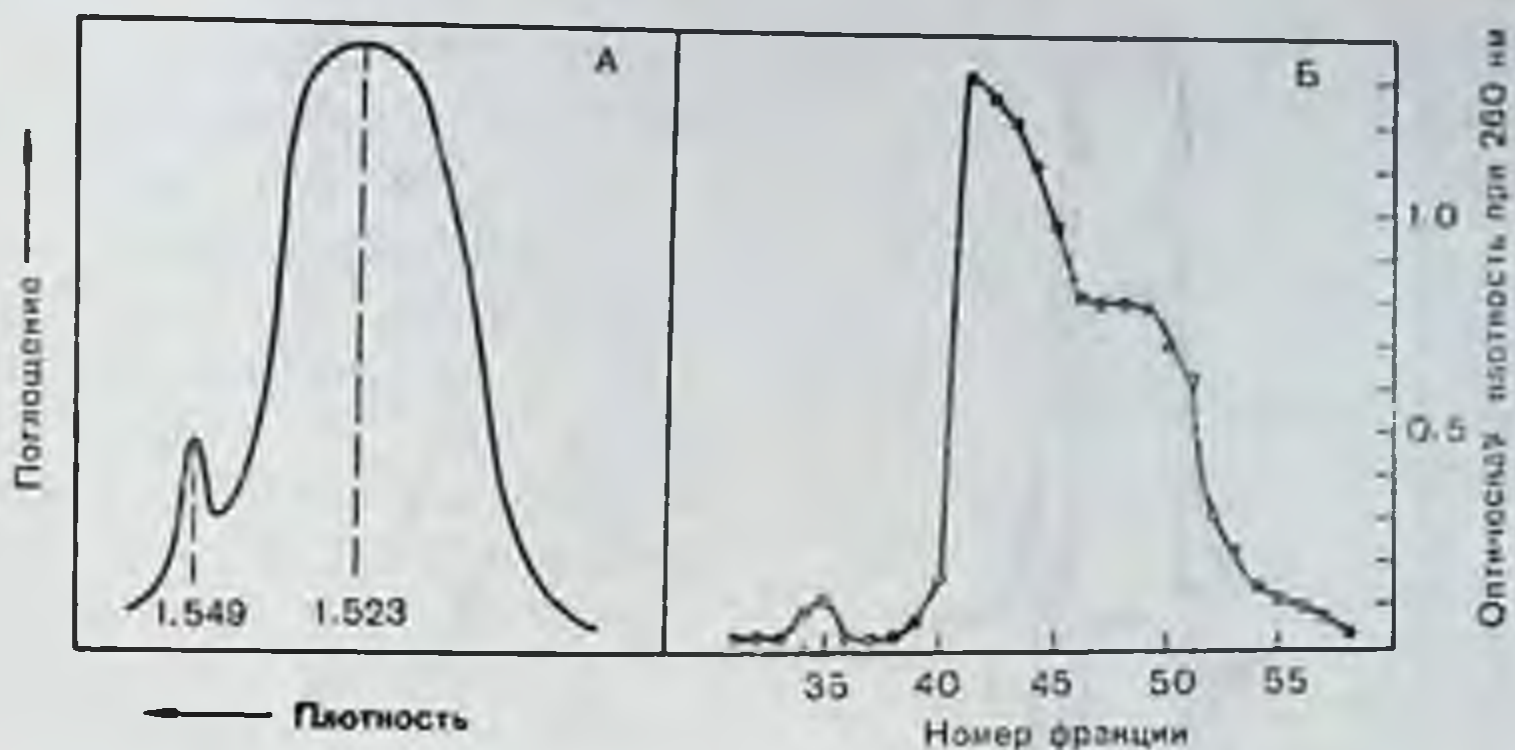
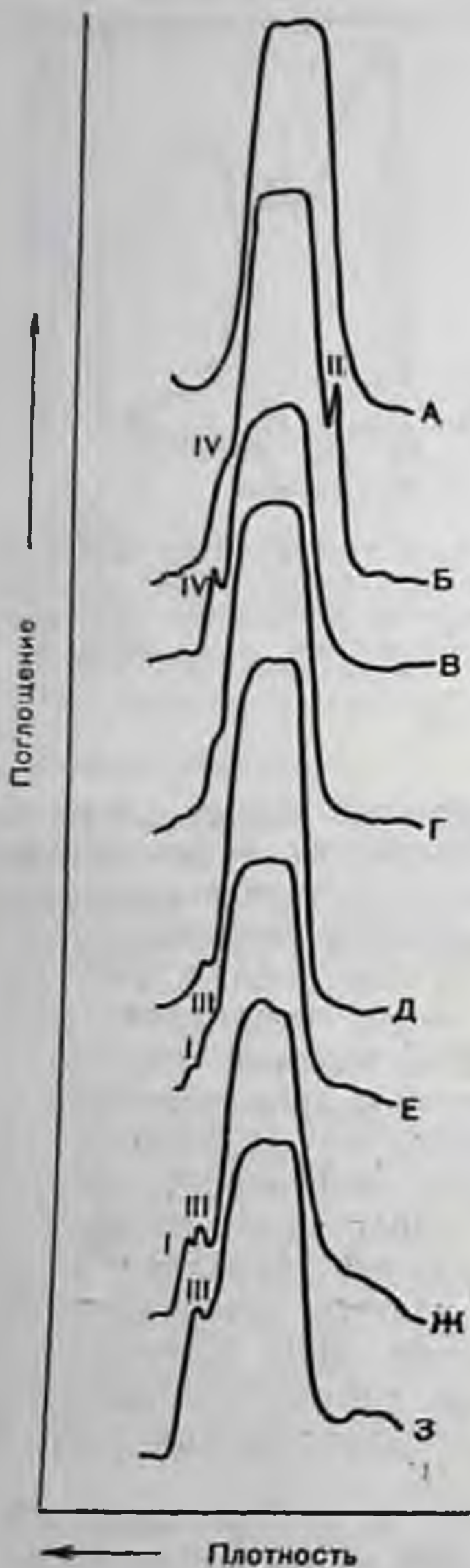


Рис. 25. Равновесное аналитическое (А) и препаративное (Б) центрифугирование в градиенте плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 , ДНК, выделенной из плаценты человека. Пик с плавучей плотностью $1,549 \text{ г/см}^3$ соответствует сателлитной ДНК II (Согнео е. а., 1970).

тральном CsCl формирует гомогенную полосу с плотностью $1,696 \text{ г/см}^3$. По ряду характеристик, включая кинетику ренатурации, этот сателлит отвечает критериям ДНК с многократными копиями последовательностей и относительно богат А—Т парами (см. табл. 1, рис. 23).

Сателлит IV был выделен после предварительного фракционирования нативной ДНК высокой относительной молекулярной массы с помощью хроматографии на метилированном альбумин-кизельгуре (Согнео е. а., 1972, 1973). Из восьми фракций, полученных элюцией МАК-колонок раствором NaCl возрастающей молярности в третьей фракции после ее центрифугирования в градиенте плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 , удается обнаружить четкую минорную полосу сателлитной ДНК, обозначенную IV (рис. 26). По своим физико-химическим свойствам сателлитная ДНК IV близка сателлиту III (см. табл. 1) и составляет около 2% всей ДНК.

При ультрацентрифугировании в нейтральном CsCl ДНК, выделенной из ядрышковой фракции хроматина, были обнаружены легкая ($1,686 \text{ г/см}^3$) и тяжелая ($1,712 \text{ г/см}^3$) сателлитные ДНК (Schildkraut, Maio, 1969). По своим свойствам первая напоминает сателлит I, а вторая ближе к сателлитам II—IV, описанным Согнео. С помощью градиента плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 выделена также сателлитная ДНК с плотностью $1,703 \text{ г/см}^3$, ко-



торая, по-видимому, соответствует сателлитам II и IV Согнео (см. табл. 1).
Итак, по данным исследований, проведенных на основе методики равновесного центрифугирования, достаточно четко вырисовывается картина глубокой гетерогенности ДНК человека и по повторяемости нуклеотидных последовательностей, и по составу азотистых оснований. Большая часть ДНК около 80%, имеет уникальные или нечасто повторяющиеся последовательности с достаточно гетерогенным нуклеотидным составом. 15% ДНК — более гомогенная фракция, с большим содержанием АТ-пар оснований. Эта ДНК определенно содержит разнообразные семейства с промежуточной повторяемостью копий. Наконец, существует ДНК с особенно высокой частотой повторяемости сходных последовательностей, отвечающая характеристикам явных или скрытых сателлитных ДНК. Четыре сателлита, охарактеризованные до настоящего времени, достаточно

Рис. 26. Равновесное аналитическое центрифугирование в градиенте плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 ДНК, фракционированной на МАК-колонке. Фракции (А—З), содержащие приблизительно одинаковое количество ДНК, элюированы растворами NaCl нарастающей молярности (0,5—0,8 М). I—IV — сателлитные ДНК. Во фракции Б—В появляется пик сателлитной ДНК IV (Согнео е. а., 1973).

близки друг к другу по кинетике ренатурации. Все они имеют относительно повышенное содержание АТ-пар, а их комплементарные нити ассиметричны. В то же время каждый сателлит имеет свои особенности.

Поведение уже выделенных сателлитных ДНК в градиенте плотности нейтрального хлорида цезия свидетельствует о том, что не исключено присутствие и других сателлитов, незначительно отличающихся от основной ДНК генома и поэтому маскируемых ею.

Поиски скрытых сателлитных ДНК, осуществленные путем изучения при ультрацентрифугировании частично ренатурированных ДНК, принесли интересные сведения (Cogneo e. a., 1973). Ренатурация была проведена при величине Cot 20 при $65^{\circ}C$ в растворе $2 \times SSC$ на ДНК с высокой относительной массой (20 000—30 000 нуклеотидных пар) и низкой (500 пар). В градиенте плотности нейтрального $CsCl$ были выделены, в том числе препаративно, два новых сателлита, названные α - и β -сателлитами. Как показало центрифугирование в сульфате цезия с катионами серебра, они распределены по всей зоне основной ДНК с плотностями 1,707 и 1,703 г/см³ и составляют 10% и 7% соответственно. Получение β -компонента из ДНК с высокой относительной молекулярной массой свидетельствует, что этот сателлит *in situ* существует в достаточно крупных блоках. Наоборот, α -компонент, будучи обнаруженным во фрагментированной ДНК, должен быть разбросан по геному небольшими порциями.

Изложенная характеристика ДНК человека, полученная методом градиентного центрифугирования, соответствует тем результатам, которые получены в экспериментах по фракционированию ДНК на гидроксилпатите и изучению кинетики ренатурации выделенных фракций (Saunders e. a., 1972; Hsu e. a., 1972). Эта группа исследователей применила два способа изучения ДНК с повторяющимися последовательностями. При первом из них денатурации подвергали фрагментированную ДНК генома в целом, без предварительного ее фракционирования. Второй способ включал предварительное фракционирование нативной ДНК на гидроксилпатите последовательной элюцией при разных температурах. Денатурации подвергали ДНК разных «температурных» элюатов. При обоих способах кинетику реассоциации изучали с использованием гидроксилпатита.

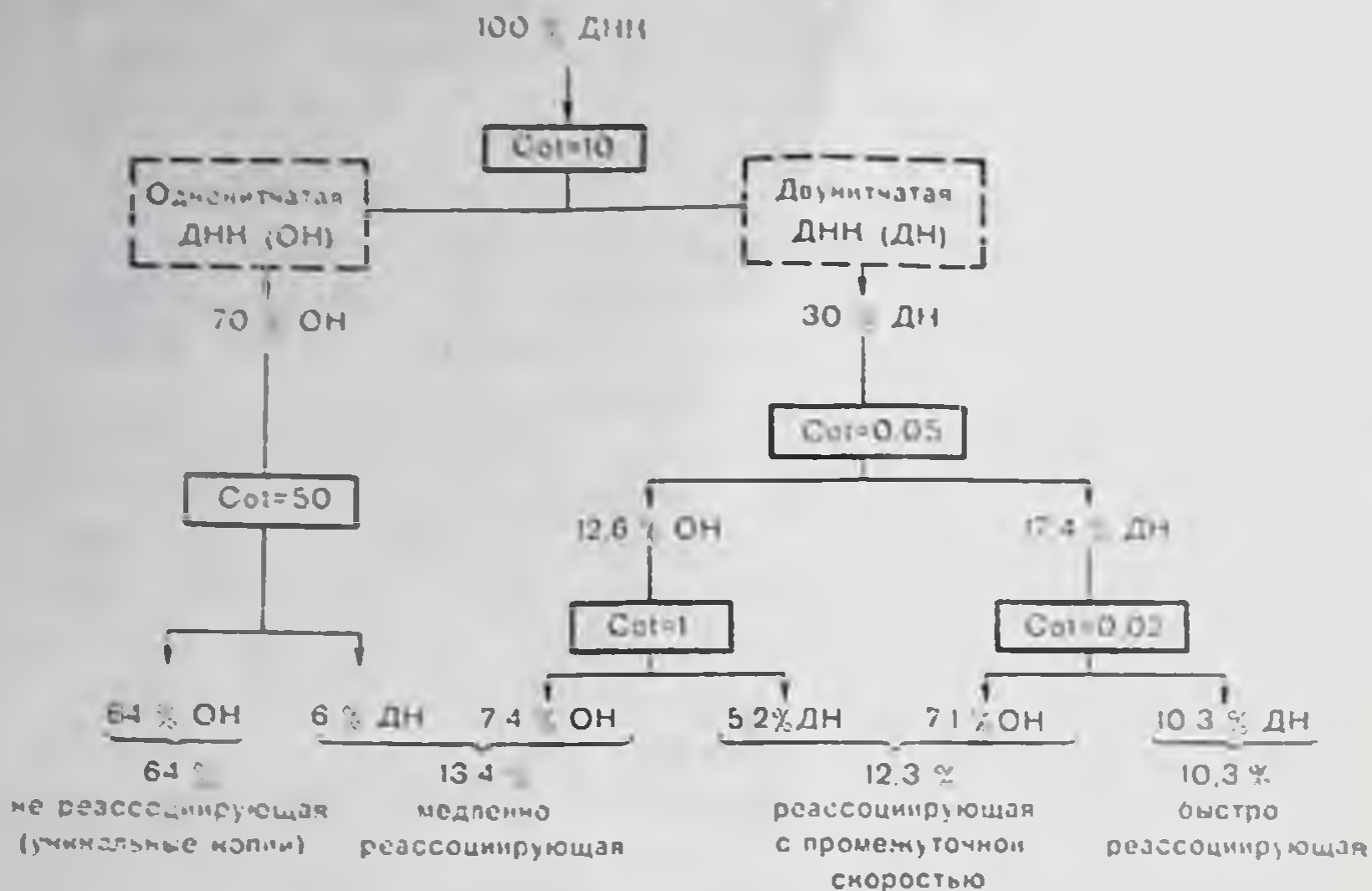


Рис. 27. Схема фракционирования озвученной ДНК человека по скорости ренатурации. Фрагментированную ДНК подвергали ренатурации при $+60^{\circ}\text{C}$, ренатурированные фракции выделены пропусканием через гидроксилпатит (Saunders e. a., 1972).

Фракционирование по скорости ренатурации полной ДНК генома показывает ее высокую гетерогенность в отношении повторяемости последовательностей (рис. 27). Авторы разделили ДНК на четыре основные фракции в зависимости от скорости ренатурации: быстро ренатурирующую (10,3%), с промежуточной скоростью ренатурации (12,3%), медленно ренатурирующую (13,4%) и уникальную (64%). Таким образом, ДНК с повторяющимися последовательностями составляет 35%, с уникальными копиями — около 65—70%. Характеристика этих фракций по плавучей плотности в градиенте плотности нейтрального CsCl выявила между ними четкие различия (рис. 28). Так, фракция с промежуточной скоростью ренатурации в противоположность быстро ренатурирующей гетерогенна, что говорит о наличии в ней нескольких семейств.

Исключительная гетерогенность ДНК человека была подтверждена изучением скорости ренатурации разнотемпературных элюатов. Предварительное фракционирование по термостабильности было рассчитано на выделение фракций ДНК с разным содержанием ГЦ-пар осно-

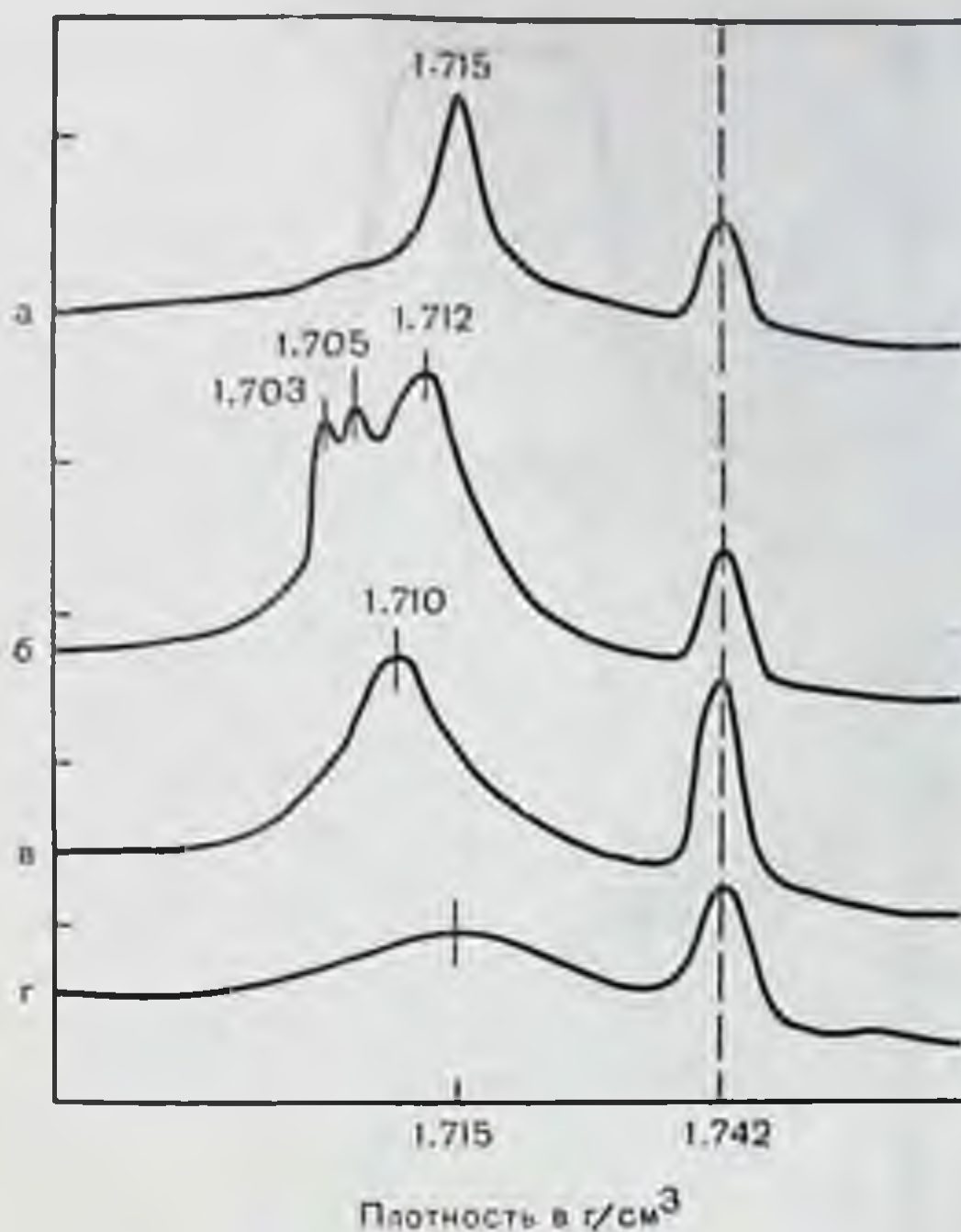


Рис. 28. Равновесное центрифугирование ренатурированных фракций ДНК (см. рис. 27) в градиенте плотности CsCl. Ренатурация проведена при $+60^{\circ}\text{C}$ и Cot 5 для быстро ренатурирующей ДНК (а) и ДНК с промежуточной скоростью ренатурации (б), при Cot 20 для медленно ренатурирующей (в) и уникальной (г) ДНК. Пик с плавающей плотностью $1,742 \text{ г/см}^3$ — ДНК бактериофага 2С *B. subtilis* (Saunders e. a., 1972).

ваний. Оказалось, что как быстро, так и медленно ренатурирующая ДНК обнаруживается практически во всех температурных элюатах. Очевидно, повторяющаяся ДНК человека распределена в широком диапазоне состава оснований, от очень высокого содержания А—Т до очень высоких величин Г—Ц.

ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФРАКЦИЙ ДНК

Основные данные по распределению в хромосомах человека различающихся по тем или иным особенностям фракций ДНК получены методом гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.

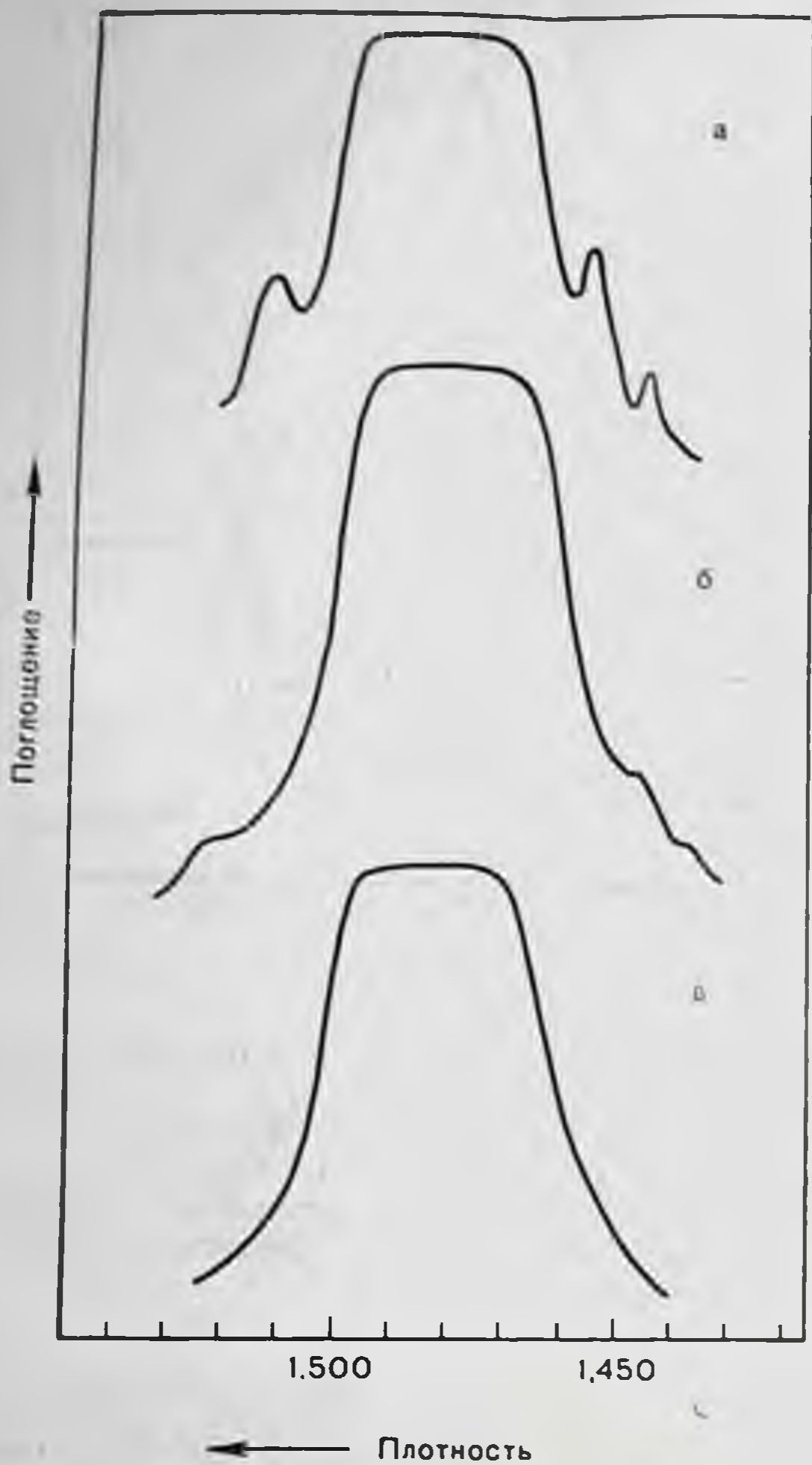


Рис. 29. Равновесное аналитическое центрифугирование в градиенте плотности Ag^+ , Cs_2SO_4 ДНК, экстрагированной из фракций.

а — гетерохроматина, б — промежуточной фракции (смесь гетерохроматина и эухроматина) и в — эухроматина. Пик сателлитных ДНК определяется только в гетерохроматине (Согнео с. а., 1971).

Гибридизация *in situ*

Первые наблюдения о неравномерном распределении повторяющихся последовательностей были получены при сравнении их содержания в разных по плотности фракциях хроматина. По данным Согнео и сотр. (Согнео с. а.,



Рис. 30. Распределение меченой тритием РНК, комплементарной сателлитной ДНК I человека, в хромосомах человека (46, XY). Особенно интенсивная метка в дистальной части длинного плеча Y-хромосомы (указано стрелкой). Менее активные районы гибридизации имеются в других хромосомах (оригинал от К. Jones).

1971), сателлитные ДНК определялись лишь во фракции плотного хроматина (гетерохроматина) и почти не обнаруживались во фракции эухроматина (рис. 29). Важное развитие эти наблюдения получили в экспериментах по гибридизации *in situ*. Во всех этих исследованиях была применена меченная тритием РНК транскрибированная *in vitro* с соответствующих фракций ДНК.

РНК, комплементарная сателлиту I, отчетливо реагировала с большинством хромосом: 1, 3, 4, 5, 9, 12, 13—15, 16, 17, 19—20, 21—22 и Y (Jones *et al.*, 1974). Особенно много зерен серебра определялось над длинным плечом Y-хромосомы, точнее над ее флуоресцирующей частью (рис. 30). Над аутосомами метка была намного слабее и занимала чаще околоцентромерные районы, реже — теломерные. Наиболее постоянно метились аутосомы 1, 3, 13, 14, 16 и 21. Авторы обращают внимание на соответствие наиболее реагирующих с РНК



Рис. 31. Распределение меченой тритием РНК, комплементарной сателлитной ДНК II человека, в метафазных хромосомах человека (46. XX). Интенсивная метка над околоцентромерными гетерохроматиновыми районами хромосом 1 и 16 с различием гомологов 1. Менее определенная локализация метки в других хромосомах (Jones, Corneo, 1971).

районов хромосом сегментам, ярко флуоресцирующим при окраске акрихинном (см. главу VI).

Сателлитная ДНК II оказалась заключенной преимущественно в околоцентромерном гетерохроматине длинных плеч аутосом 1 и 16, несколько в меньшей степени — аутосомы 9 (рис. 31) (Jones, Corneo, 1971). Интересно отметить, что различие гомологов хромосомы 1 по величине гетерохроматина совпадало с различием в площади, занимаемой меткой. Значительно меньшими блоками сателлит II распределен по большинству других хромосом с тенденцией к концентрации метки в райо-



Рис. 32. Распределение меченой тритием РНК, комплементарной сателлитной ДНК III человека, в хромосомах человека. Преимущественная локализация метки в околоцентромерном гетерохроматиновом районе хромосомы 9. Более мелкие районы гибридизации в других хромосомах (Jones e. a., 1973).

нах центромер хромосом групп D, F, G. Принадлежность сателлита II к гетерохроматину подтверждается тем, что в интерфазных ядрах меченая РНК связывается преимущественно с материалом хромоцентров.

Еще более ограниченное распределение имеет сателлитная ДНК III (Jones e. a., 1973). Она обнаруживается в основном в хромосоме 9, строго соответствуя крупному гетерохроматиновому району длинного плеча (рис. 32). При более продолжительной экспозиции под эмульсией метка выявляется и в околоцентромерных районах хромосом групп D и G. В интерфазном ядре метка также образует два основных скопления, соответствующих кон-

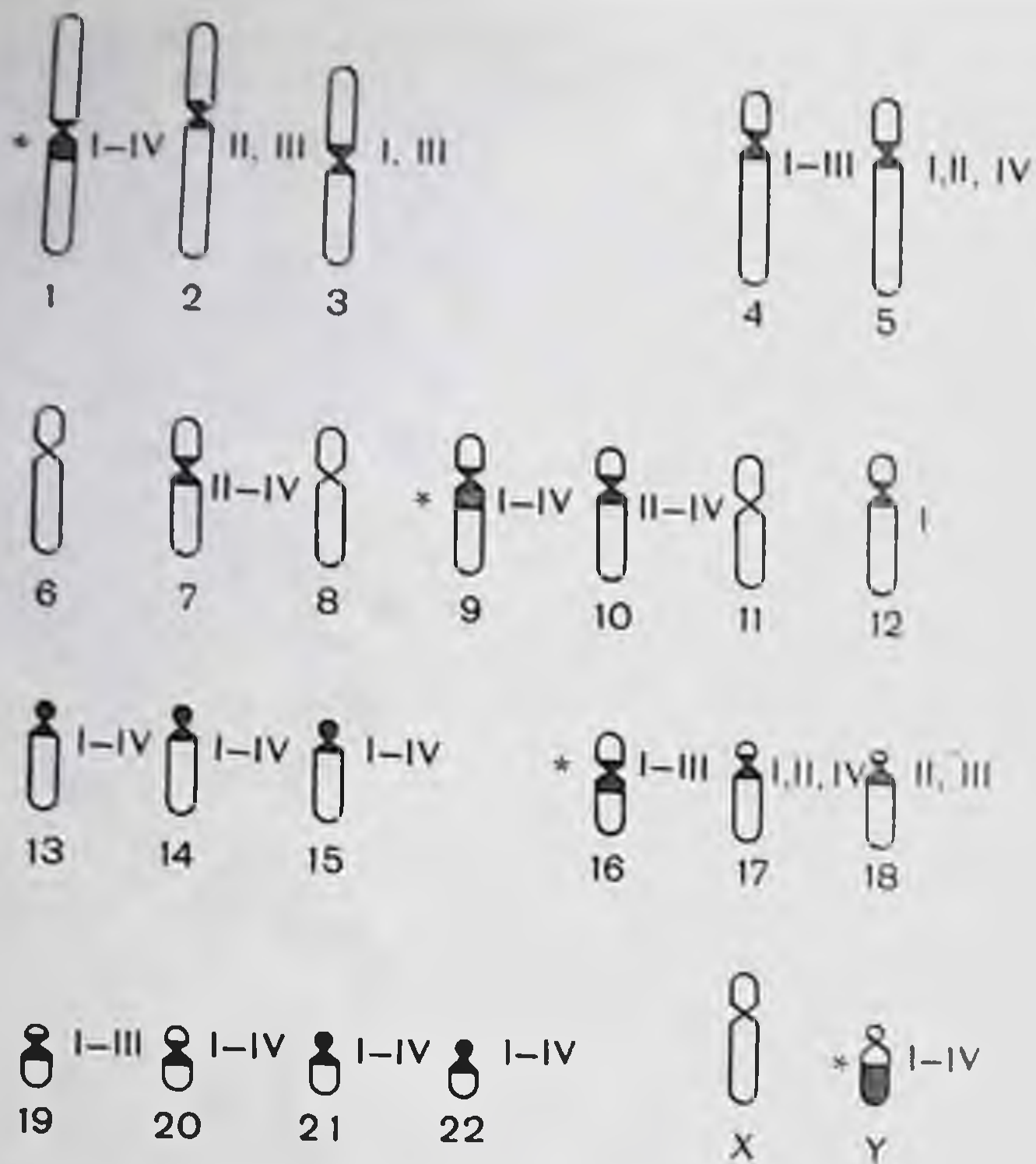


Рис. 33. Схема локализации в хромосомах человека сателлитных ДНК I—IV, построенная на основе данных Jones с сотрудниками и Gosden с сотрудниками (см. текст). Размеры и плотность закрашенных районов хромосом условны и не отражают реальной интенсивности гибридизации. Звездочкой отмечены хромосомы, содержащие особенно большое количество сателлитной ДНК.

денсированному хроматину аутосомы 9 (см. рис. 4). Сателлитная ДНК, близкая по своим свойствам сателлиту III и выделенная Saunders с сотр. (1972), также локализована, по данным опытов гибридизации на хромосомах, в гетерохроматине аутосомы 9 и околоцентромерных районов акроцентрических хромосом.

Сателлитная ДНК IV содержится в гетерохроматиновых районах ряда хромосом, особенно акроцентрических и Y-хромосомы (Gosden e. a., 1975). В этой же работе получены данные о локализации сателлитных ДНК I—III, несколько отличающиеся от цитированных выше (рис. 33).

Полученные данные, несмотря на их некоторую противоречивость у разных авторов, позволяют сделать определенные выводы. 1. Сателлитные ДНК человека содержатся преимущественно в околоцентромерных гетерохроматиновых районах хромосом. 2. Между хромосомами сателлиты распределены очень неравномерно, концентрируясь в крупные блоки в немногих хромосомах, но присутствуя в небольших количествах если не во всех, то в большинстве элементов набора. 3. Разные сателлиты имеют преимущественную локализацию в разных хромосомах, при этом особенно выделяются Y-хромосома, содержащая сателлит I и IV, аутосома 1 и 16 как основное место сателлита II и аутосома 9 как главный носитель сателлита III (рис. 33). «Гомогенная» ДНК основного пика не имеет преимущественной локализации в той или иной хромосоме. Можно ожидать, что успешное разделение этой части ДНК, обладающей промежуточной скоростью ренатурации, на семейства приведет к уточнению ее локализации в индивидуальных хромосомах.

Еще большая дисперсия по всем хромосомам и по многим участкам каждой из них обнаружена для фракций ДНК, полученных с помощью разделения полной ДНК генома на оксиапатите. РНК, комплементарная фракции уникальных последовательностей (см. рис. 27), не гибридизировалась с ДНК хромосом (Aggrighi e. a., 1971). РНК, синтезированная на суммарной повторяющейся ДНК и на быстро ренатурирующей ее части, обнаруживалась во всех хромосомах набора по всей их длине, однако с большей концентрацией метки над центромерными и теломерными хромосомными сегментами. ДНК с промежуточной скоростью ренатурации имела тенденцию обнаруживаться в большей мере в интерстициальных участках хромосом.

Эти наблюдения и выводы получили дальнейшее развитие в опытах по выяснению локализации ДНК, выделенной из фракций, которые предварительно были получены элюцией нативной ДНК через оксиапатит в разных температурных режимах (Saunders e. a., 1972; Hsu e. a., 1972). Меченные тритием комплементарные РНК были получены к пяти фракциям, каждая из которых была ренатурирована при двух различных значениях Cot (табл. 2). Другими словами, была исследована локализация ДНК как с многократно, так и с редко повторяющимися

последовательностями и с разным отношением А—Г: Г—Ц. Распределение меченой РНК было изучено по длине хромосом 1, 2, 3, 9 и 16 с разделным подсчетом зерен серебра для теломерных, интерстициальных и центромерного районов. Табл. 2 документирует полученные результаты на примере хромосомы 1.

Таблица 2

ИНДЕКС ГИБРИДИЗАЦИИ (ОТНОШЕНИЕ ЧИСЛА ЗЕРЕН СЕРЕБРА К ДЛИНЕ КАЖДОГО РАЙОНА В %) В ХРОМОСОМЕ 1 ЧЕЛОВЕКА
(Ильин, 1972)

Эт. ат. °С	Col	Районы*					Общее количество зерен серебра
		ТД	ИД	Ц	ИК	ТК	
80—85	0—0,05	1,9	0,6	3,3	0,7	2,2	213
85—90	0—0,05	2,0	0,5	3,7	0,7	2,2	283
90—92	0—0,05	1,8	0,8	1,1	1,0	2,2	339
92—95	0—0,05	3,2	0,8	0,6	0,9	1,5	316
95—97	0—0,05	1,7	0,6	0,8	1,3	2,1	230
80—85	0,05—50	0,9	0,7	1,1	1,5	0,0	29
85—90	0,05—50	3,5	0,8	0,9	1,1	0,6	81
90—92	0,05—50	1,7	0,9	1,3	0,9	2,3	88
92—95	0,05—50	0,8	0,9	0,6	1,3	1,8	194
95—97	0,05—50	1,8	1,0	0,3	1,0	2,7	113

* ТД, ТК — теломерные районы длинного и короткого плеч (соответственно).

ИД, ИК — интерстициальные районы длинного и короткого плеч (соответственно).

Ц — центромерный район.

Авторы пришли к следующему общему заключению. ДНК с многократно повторяющимися последовательностями локализуется предпочтительно в центромерных и теломерных районах. ДНК с промежуточной и низкой повторяемостью копий обнаруживалась по всей длине плеч с несколько большей концентрацией метки в интерстициальных районах. В гетерохроматиновых районах хромосом, прежде всего в околоцентромерных и теломерных, обнаруживалась РНК, комплементарная ко всем пяти фракциям. Следовательно, гетерохроматин человека состоит из различных семейств повторяющихся последовательностей, которые различаются как по числу



Рис. 34. Распределение меченой тритием рибосомной РНК (18S и 28S) в нормальных метафазных хромосомах человека. Метка локализуется над короткими плечами акроцентрических хромосом (в кружке спутничная ассоциация) (Evans e. a., 1974).

копий, так и по нуклеотидному составу. Авторы предполагают, что ДНК с большим содержанием ГЦ-пар в большей мере содержатся в теломерных, чем центромерных, районах.

Подтверждение изложенным наблюдениям получено другими исследователями (Sanchez, Yunis, 1974, и др.).

Еще одно направление в картировании хромосом человека по особенностям ДНК представлено работами, в которых исследовалась хромосомная локализация естественно транскрибируемых полигенных локусов, кодирующих рибосомную РНК.

О локализации рибосомных генов в 10 акроцентрических хромосомах человека были получены важные сведения в цитологических и биохимических работах до разработки метода гибридизации нуклеиновых кислот



Рис. 35. Распределение меченой ^{125}I 5S РНК в хромосомах человека. Интенсивная метка над дистальным районом длинных плеч аутосомы 1 (указано стрелкой). (Оригинал от D. Steffensen.)

in situ (Bross, Krone, 1973, и др.). Первая группа исследователей, начавших гибридизацию рибосомной (18S—28S) РНК с ДНК на хромосомных препаратах (Henderson e. a., 1972; Yu e. a., 1974), использовали для гибридизации выделенные биохимически рибосомные РНК, меченные как ^3H , так и ^{125}I . При просмотре метафазных пластинок скопления зерен серебра обнаруживались над короткими плечами всех трех пар хромосом группы D и двух пар хромосом группы G. В результате статистической оценки распределения зерен серебра над короткими плечами акроцентрических хромосом сравнительно с меткой в области длинных плеч этих хромосом и околоцентромерных районов других хромосом набора сделано заключение, что специфическое связывание рРНК наблюдается только в районах центромер и коротких плеч

акроцентрических хромосом. Данные этой группы исследований полностью подтверждены Evans с соотр. (1974), которые для индикации рибосомных цистронов использовали меченую тритием рибосомную РНК *Xenopus laevis* (рис. 34). Рибосомные цистроны у человека содержатся, по-видимому, не только в акроцентрических хромосомах (Pardo e. a., 1975).

Другим полимерным геном, локализация которого была предметом изучения, является ген 5S РНК, которая входит в состав рибосом. Выделенная из полисом клеток HeLa и меченная ^{125}I 5S РНК гибридизируется преимущественно с субтерминальным районом длинного плеча аутосомы 1, хотя с меньшим постоянством и интенсивностью метку можно определить и в других хромосомах (рис. 35) (Steffensen e. a., 1974). Отдельного упоминания заслуживает вопрос о возможности определения в хромосомах локализации структурных генов на основе метода гибридизации *in situ*. Этот вопрос поставлен сообщением об обнаружении этим методом в хромосоме 2 и одной из пар группы В локализации структурных генов гемоглобина (Price e. a., 1972), которое вызвало критику. Расчеты показали, что при той удельной активности, которой обладал использованный в работе препарат меченой информационной РНК, радиоавтографическое определение локуса глобина даже при 100% эффективности гибридизации возможно, если локус включает не менее 5% всей ДНК генома. Это на несколько порядков выше реального количества ДНК в этом локусе. Тем не менее экспериментальная проверка подтвердила данные Price и соавт. (Rotterdam Conference, 1974).

Результаты, полученные другими методами

Приведенные выше сведения по биохимической характеристике ДНК человека и по локализации различных ее фракций и классов в хромосомах в опытах гибридизации *in situ* свидетельствуют об отсутствии в геноме человека крупных фракций ДНК, в которых значительно преобладали бы пары А—Т или Г—Ц. Немногочисленные данные, полученные с помощью других методов, не противоречат этим сведениям.

Работы по сравнительному радиоавтографическому анализу включения в хромосомы человека ^3H -тимидина и ^3H -дезоксицитидина единичны. Schnedl (1973a) обна-

ружил, что в поздний отрезок S-периода оба предшественника включаются в одни и те же районы хромосом. По его мнению, по сравнению с ^3H -тимидином меченый дезоксицитидин дает менее четкую картину асинхронности включения, если не считать околоцентромерных районов аутосом 1, 9 и 16. Количественное сравнение интенсивности включения обоих предшественников в последние 6 ч S-периода было проведено Hook и Hatcher (1973) на клетках крови 4 индивидов. Подсчет зерен серебра проводили на хромосому в целом, а не на ее участки. Авторы не обнаружили статистически достоверного различия в интенсивности включения тимидина и дезоксицитидина. Вместе с тем ими отмечена такая тенденция в распределении метки, которая позволила предположить, что поздно редуцирующиеся районы хромосом с более ранним окончанием синтеза ДНК содержат больше ГЦ-пар, с более поздним окончанием — больше АТ-пар.

Более методически полноценное исследование провели С. И. Слезингер с сотр. (1974), используя культивируемые фибробласты и лимфоциты крови. В их экспериментах оба предшественника с одной и той же удельной активностью и в одинаковой дозе были доступны клеткам в течение всего клеточного цикла. Подсчет метки в аутосомах 1 и 2 показал, что количество пар А—Т и Г—Ц в хромосоме 1 в фибробластах выше в теломерных и центромерных сегментах, чем в средних участках плеч, тогда как в лимфоцитах различий не было. В хромосоме 2 в клетках обоих типов большее содержание метки наблюдалось в теломерных районах. К сожалению, по материалам авторов о содержании АТ- или ГЦ-пар относительно друг друга составить представление нельзя.

Несколько иной подход к изучению состава азотистых оснований ДНК в разных участках хромосом намечен в наших работах (Zakharov e. a., 1974; Vaganovskaya, Zakharov, 1974). На лимфоцитах крови человека сопоставлена локализация сегментов, включающих 5-бромдезоксиуридин (предшественник тимина) и выявляемых по отстаиванию в конденсации и включающих меченый дезоксицитидин. Выгодная сторона такого подхода состоит в возможности анализа включения обоих предшественников одновременно на одной и той же хромосоме, а также в том, что при избытке в среде 5-бромдезоксиуридина дезоксицитидин используется только на синтез ци-

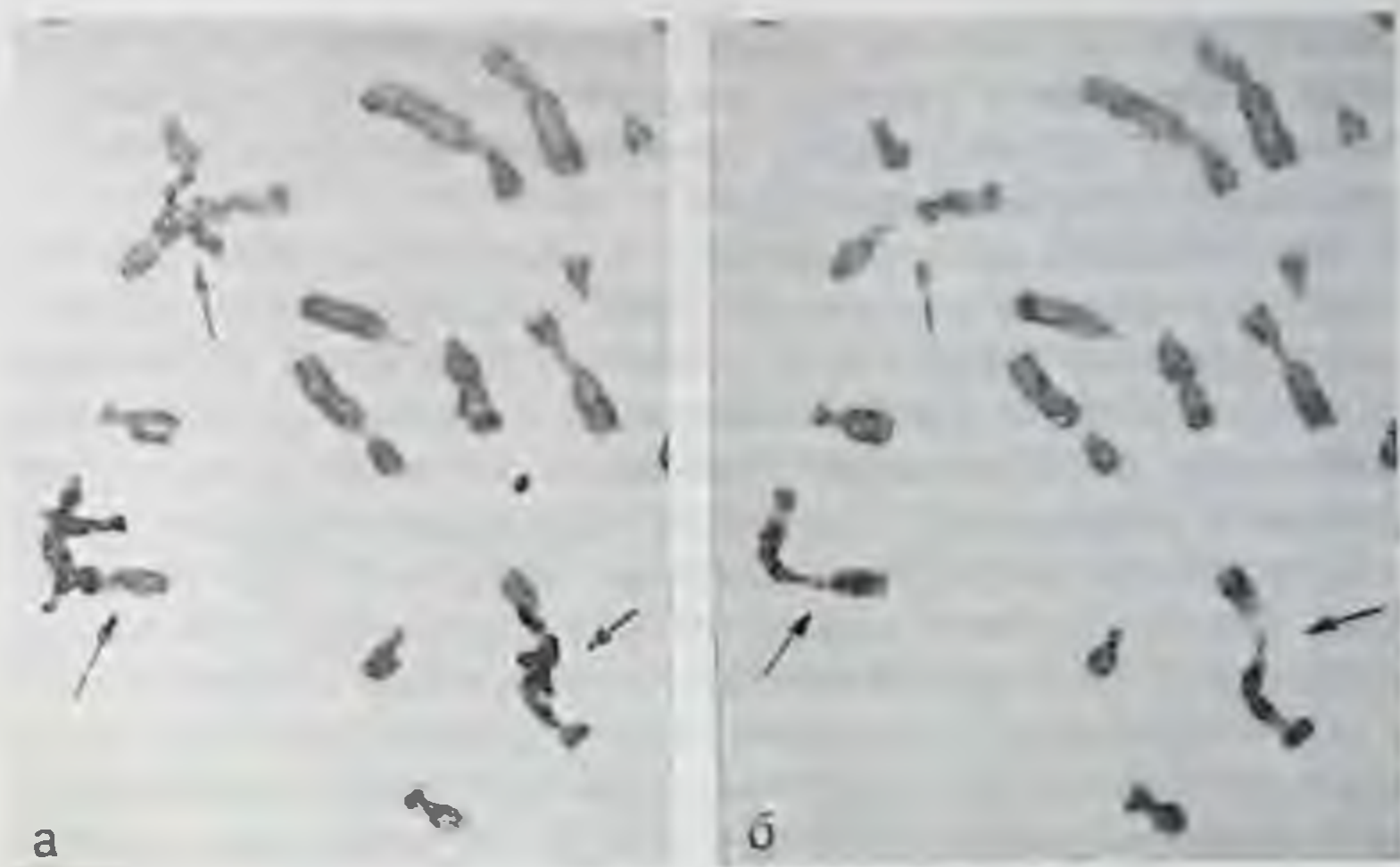


Рис. 36. Локализация ^3H -дезоксицитидина (а) в районах задержанной конденсации, вызванной включением в них 5-бромдезоксиуридина (б). Случай 19, XXXY (стрелкой указаны три генетически инактивированные X-хромосомы).

тозина. Слабая его сторона — это количественная несопоставимость обоих показателей. При качественной оценке меченые участки в основном совпадали с растянутыми районами (рис. 36). В других экспериментах было проведено сравнение положения и размеров хромосомных сегментов после воздействия на лимфоциты 5-бромдезоксиуридином и 5-бромдезоксицитидином. По предварительным данным, полученным при использовании качественной оценки, не удалось выявить заметных различий в рисунке дифференциальной конденсации хромосом в ответ на действие аналогов тимидина и цитидина.

Приведенные в этом разделе сведения следует рассматривать как весьма ориентировочные. Можно согласиться с данными этих работ, свидетельствующими об отсутствии в карิโอטיפе человека участков хромосом, состоящих преимущественно из аденин-тиминовых или гуанин-цитозиновых нуклеотидов и доступных для обнаружения при световой микроскопии. Однако такое заключение не означает, что не имеется различий в достаточно мелких участках хромосом или при сравнении

между собой рано и поздно редуцирующихся районов. Имеющиеся работы следует расценить как первые поисковые исследования, требующие подтверждения более совершенными методами.

Применение флуорохромов в качестве инструмента анализа состава оснований ДНК в хромосоме началось с исследования Caspersson с сотр. (1968 а, б), применивших для этого акрихин — иприт в надежде на выявление участков, обогащенных гуанином. В этом разделе коснемся тех сведений, которые позволяют предполагать, что дифференциальное свечение хромосом при связывании флуорохромов отражает распределение вдоль хромосомы ДНК с различным нуклеотидным составом.

Существенная зависимость интенсивности свечения от состава оснований получена при изучении взаимодействия флуорохромов с нативными ДНК или синтетическими полинуклеотидами в растворах. По данным Weisblum (1974), разные акридиновые красители взаимодействуют с двуничей ДНК по-разному: 1 — вызывают гашение флуоресценции как А—Т, так и Г—Ц-нуклеотидов (9-аминоакридин); 2 — усиливают флуоресценцию А—Т-полнуклеотидов и гашение флуоресценции Г—Ц-полнуклеотидов (акрихин); 3 — усиливают флуоресценцию нуклеотидов того и другого типа (акридиновый оранжевый). По отношению к акрихину усиление свечения при его связывании с ДНК А—Т-состава и гашение при взаимодействии с Г—Ц-нуклеотидами показано в ряде работ (Weisblum, Haseh, 1972; Selander, 1973; Selander, de la Chapelle, 1973; Weisblum, 1973). Однако квантовый выход свечения зависит не только от процентного соотношения А—Т: Г—Ц, но также от их взаимного распределения в молекуле ДНК. При прочих равных условиях гашение свечения будет сильнее, если пары Г—Ц распределены между парами А—Т более равномерно (Weisblum, 1973, 1974). На интенсивность свечения в растворах оказывает влияние и вторичная структура ДНК: нативная ДНК независимо от состава оснований усиливает свечение (Selander, de la Chapelle, 1973; Weisblum, 1974). Наконец, показано модифицирующее флуоресценцию влияние со стороны полипептидов, например полилизинов в случае их добавления к растворам ДНК (Weisblum, 1974).

Таким образом, уже модельные эксперименты заставляют с осторожностью связывать картины свечения хро-

мосом с составом оснований входящей в них ДНК. Действительность подтверждает эти опасения. Окрашенные акрихином хромосомы человека имеют весьма характерное распределение полос разной степени флуоресценции по их длине (см. с. 132 главы VI). Большинство принято связывать участки повышенного свечения с содержанием большого количества АТ-пар оснований, пониженного свечения — с преобладанием ГЦ-пар. Из того, что нам известно о локализации в околоцентромерном гетерохроматине хромосом 1, 9 и 16 обогащенной А—Т сателлитной ДНК, можно заключить, что эти районы должны флуоресцировать ярко. Между тем они светят особенно слабо. Флуорохрому 2,7 ди-1-бутилпрофлавину, по данным предложивших его исследователей (Disteche, Bontemps, 1974), свойственна меньшая зависимость при взаимодействии с ДНК от факторов, помимо состава оснований. В частности, нет столь сильного гашения флуоресценции со стороны ГЦ-пар и нуклеогистонов. Действительно, этот флуорохром окрашивает обогащенные аденин-тиминном околоцентромерные районы хромосом 1, 9 и 16. Сходными особенностями характеризуется препарат Хехст 33258, поэтому он также рекомендуется как специфический индикатор на содержащие А—Т участки хромосом (Weisblum, Haenssler, 1974). На хромосомах человека и мыши он, в противоположность акрихину, активно окрашивает районы хромосом с обогащенной А—Т сателлитной ДНК. Последующие исследования должны будут показать, насколько обосновано заключение ряда авторов о возможности с помощью флуорохромов безошибочно судить об относительном содержании в хромосомных районах одних или других пар оснований.

Использование антисывороток, специфических к тем или иным основаниям ДНК, для суждения об их содержании в индивидуальных хромосомах или их участках имело место в единичных работах. В одной из них (Dev e. a., 1972) были применены антиаденозиновые антитела. После обработки хромосом с денатурированной ДНК этими антителами в прямой реакции Кунса обнаруживалось дифференциальное свечение по длине хромосом. Светящиеся сегменты соответствовали активно окрашивающимся районам хромосом при Q- или G-окраске. Специфичность реакции антител с участками хромосом была подтверждена в опытах с антисывороткой к цитози-

ну, доступность которого для антител была обеспечена избирательным фотохимическим разрушением противоположащего в молекуле гуанина (Schreck e. a., 1973). Рисунок свечения, вызываемого этими антителами, был противоположен вызываемому антителами к аденозину. Однако имеются обстоятельства, которые заставляют пока с осторожностью трактовать зоны активной иммунохимической флуоресценции в зависимости от содержания пар оснований. По результатам обеих работ, околоцентромерные гетерохроматиновые районы хромосом, особенно богатые сателлитной ДНК, не реагировали на антитела. Приходится допустить, что на распределение антител по длине хромосомы влияет не только нуклеотидный состав, но и какие-то другие факторы. До выяснения их природы понимание феномена дифференциального свечения хромосом при обработке их антителами к основаниям ДНК остается неполным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В широко развернувшихся исследованиях состава ДНК эукариотов по повторяемости последовательностей нуклеотидов и их составу, а также по определению хромосомной локализации различающихся семейств и фракций ДНК использование генома человека занимает видное место. Фракционирование при равновесном центрифугировании и на гидроксилпатите, отдельно и в сочетании обнаружило высокую гетерогенность ДНК человека и позволило выделить некоторые фракции, которые различаются по количеству повторяющихся одинаковых последовательностей нуклеотидов и составу азотистых оснований. Геном человека содержит не менее 30% ДНК с повторяющимися последовательностями, из них около 10% ДНК обладает высокой скоростью реассоциации, отвечая характеристикам ДНК с многократной повторяемостью одинаковых нуклеотидных последовательностей. Методом равновесного центрифугирования обнаружено существование в геноме человека явных и скрытых сателлитных ДНК, из которых четыре (I—IV) достаточно хорошо охарактеризованы. Все они имеют повышенное содержание АТ-пар оснований, асимметричность комплементарных нитей молекулы. Работа по выделению индивидуальных семейств ДНК в геноме человека только начинается, и с прогрессом методов такого

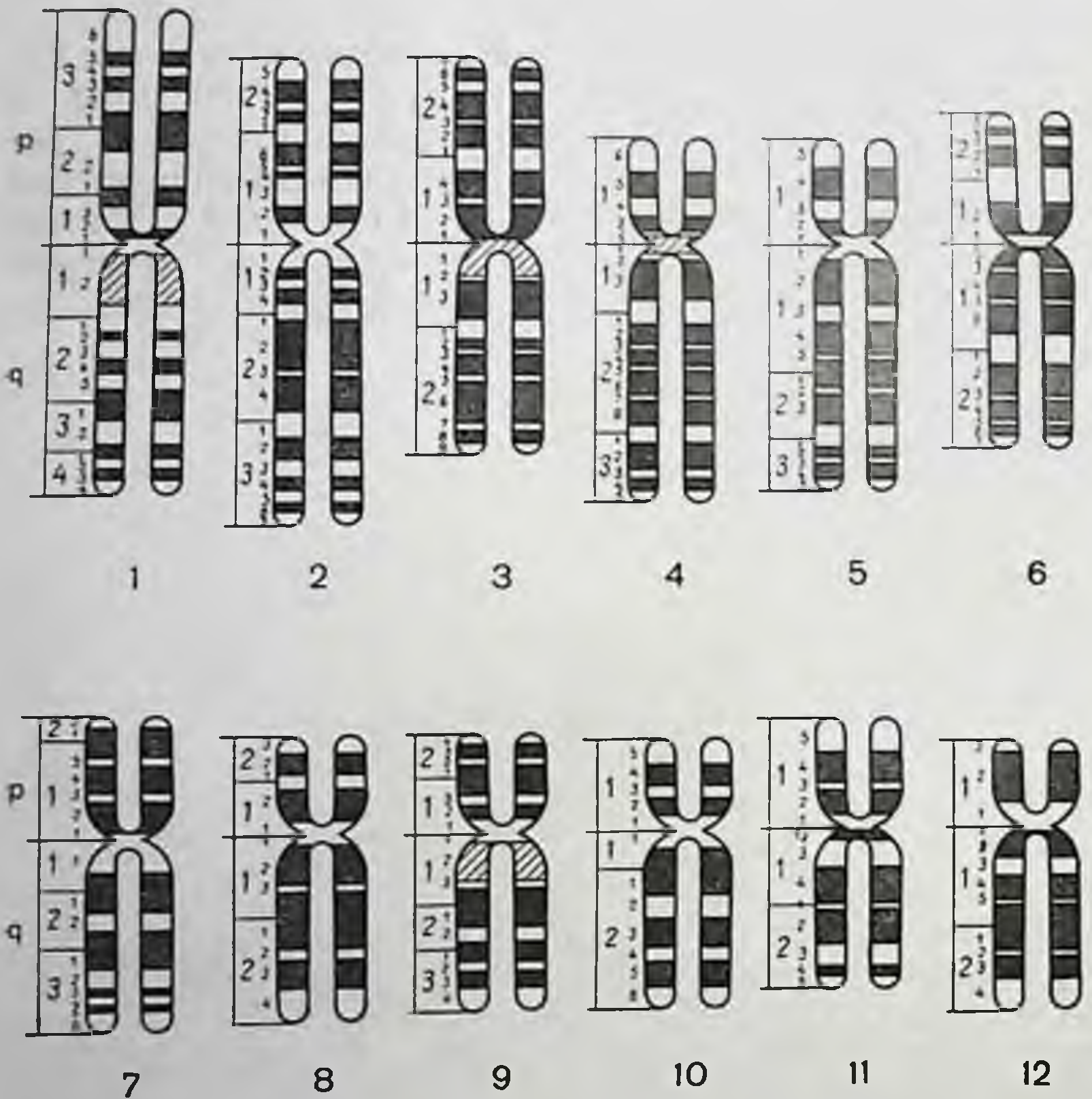
выделения можно рассчитывать на получение новых индивидуальных классов ДНК.

Достигнуты определенные успехи в определении локализации разных типов и классов ДНК в хромосомах человека, в основном методом гибридизации нуклеиновых кислот на препаратах хромосом. Установлено, что ДНК, кодирующая рибосомную 18S и 28S РНК, содержится в коротких плечах всех акроцентрических хромосом. Гены 5S РНК локализованы преимущественно в субтерминальном районе длинного плеча хромосомы 1. Сателлитные ДНК обнаруживаются в гетерохроматиновых околоцентромерных районах многих, если не всех, хромосом, но локализуются они неравномерно, с предпочтительным расположением отдельных сателлитов в определенных хромосомах (сателлит I и IV — Y-хромосома, сателлит II — хромосомы 1 и 16, сателлит III — хромосома 9). ДНК со средней и малой частотой повторяемости последовательностей распределены, по-видимому, по длине плеч хромосом, но современные методы не позволяют точно дифференцировать их локализацию в пределах данной хромосомы. Это остается задачей, решение которой будет означать существенный шаг вперед в химическом картировании хромосом человека, в понимании связи между особенностями ДНК и другими структурными и функциональными характеристиками районов хромосом.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОКРАШИВАЕМОСТЬ ХРОМОСОМ

ВВЕДЕНИЕ

Мы уже коснулись в главе I истории развития и основной классификации методов дифференциальной окраски хромосом, подчеркнув исключительное значение их разработки для дальнейшего углубления наших знаний об организации хромосомы, равно как и для идентифика-



ции хромосом, с широким выходом в разные области цитогенетики.

Решающим фактором в разработке и широком современном использовании методов дифференциальной окраски явились практические запросы медицинской цитогенетики в деле идентификации хромосом человека при их численных и структурных перестройках. Из материалов предыдущих глав следовало, что, несмотря на большие успехи, достигнутые в изучении структурных и функциональных особенностей индивидуальных хромосом и их участков к началу 70-х годов, в цитогенетике человека не было достаточно отработанных методических подходов к раскрытию индивидуальных особенностей каждой хромосомы.

Сейчас применение методов дифференциальной окраски пронизало всю цитогенетику человека. В методическом плане основные разработки, по-видимому, уже закончены. Расположение в хромосомах по-разному окра-

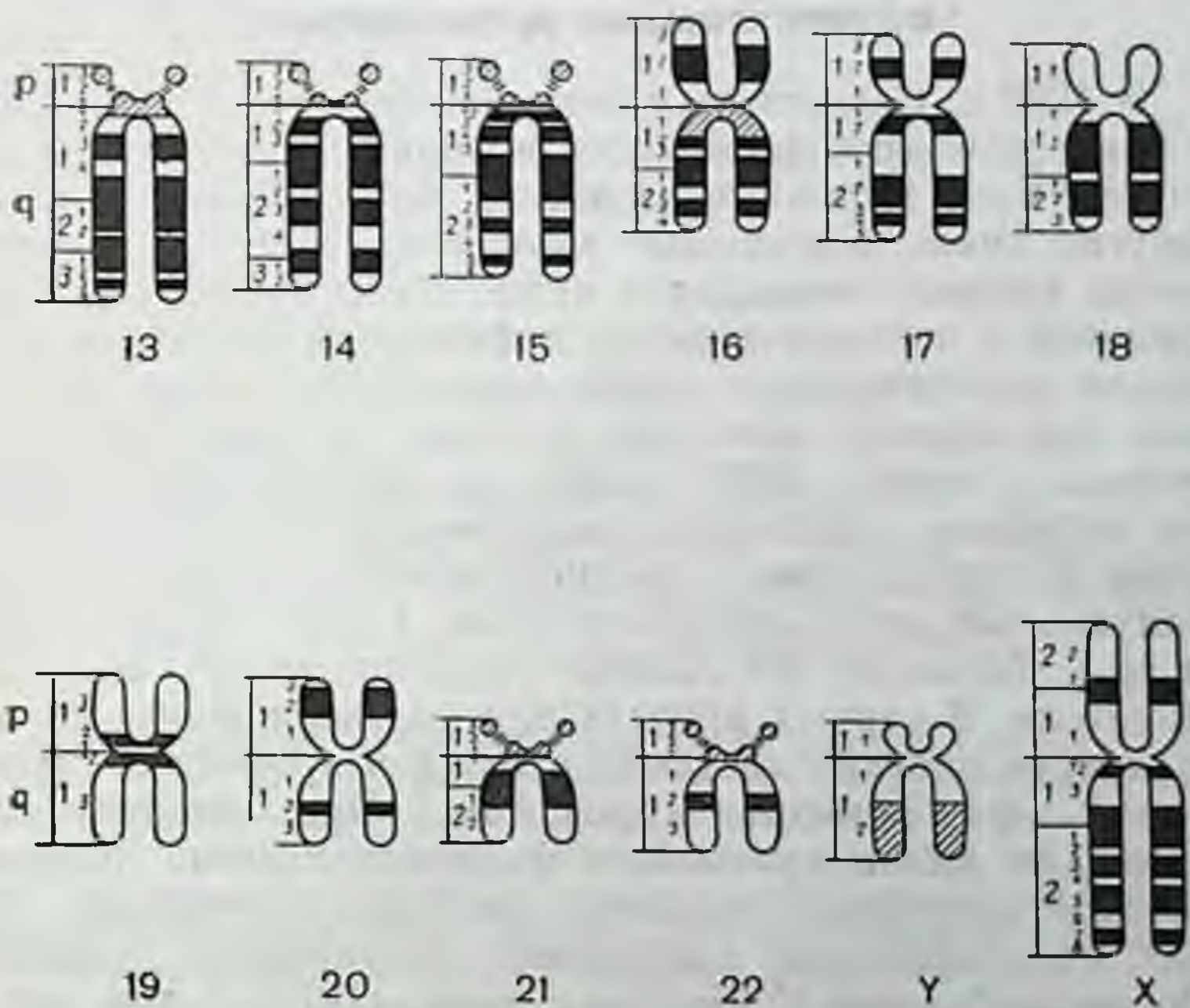
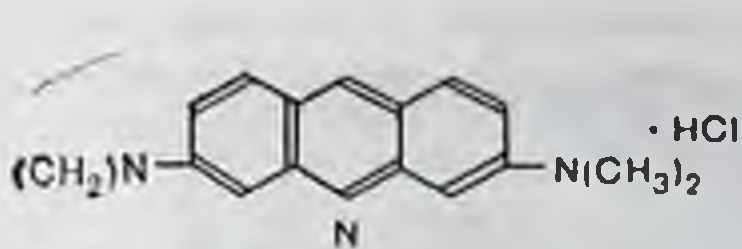


Рис. 37. Схематический рисунок дифференциального окрашивания хромосом по Q-, G- и R-методикам; центромеры обозначены в соответствии с Q-окрашиванием. Районы непостоянного окрашивания обозначены косой штриховкой (Paris Conference, 1971).

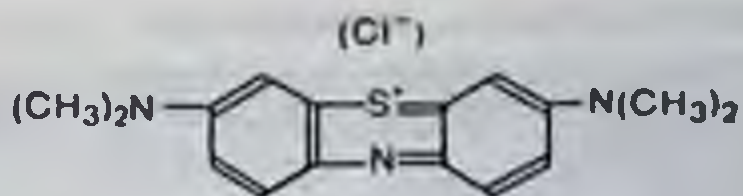
шивающихся сегментов едино для Q-, G и R-окрасок, и его схема, предложенная Парижским совещанием по стандартизации номенклатуры в цитогенетике человека (Paris Conference, 1971), стала общепринятой (рис. 37). В дополнение к названным этим совещанием четырем методам сейчас предложены окраски на специфические районы отдельных хромосом. При цитогенетическом обследовании индивидов с неясными хромосомными аномалиями все чаще прибегают к использованию комплекса методик, дополняющих друг друга. Рассмотрим методы дифференциальной окраски и выявляемую с их помощью картину линейной расчлененности хромосом человека, придерживаясь Парижской классификации методов (А. Ф. Захаров, 1973; А. А. Прокофьева-Бельговская, 1974; Comings, 1972; Hsu, 1973; Dutrillaux, Lejeune, 1975).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОКРАШИВАЕМОСТЬ ХРОМОСОМ ФЛУОРОХРОМАМИ (Q-ОКРАШИВАНИЕ)

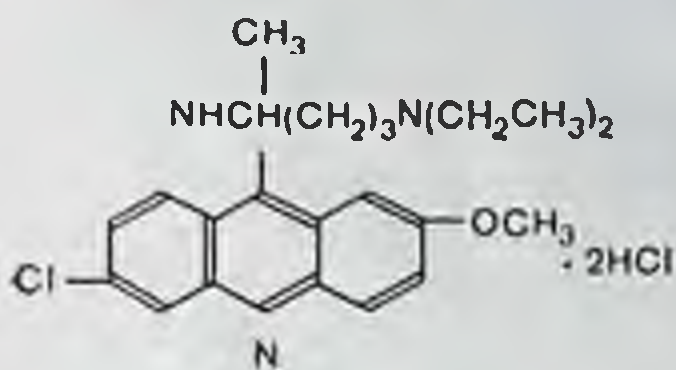
В 1969 г. Caspersson с сотр. (1969а, б) успешно испытывали с целью избирательного окрашивания участков хромосом *Vicia faba* акрихин-иприт, акрихин и некоторые другие аминопроизводные акридина, структурные формулы которых приводятся ниже. Наиболее четкое, стабильное и воспроизводимое дифференциальное свечение давал акрихин-иприт, что и определило его использование для окраски хромосом человека. В серии опубликованных в течение 1970 г. работ группа Caspersson описала методику применения акрихин-иприта, технику анализа флуоресценции и рисунок свечения по длине индивидуальных хромосом (Caspersson, Lomakka, Zech, 1971, и др.). Тогда же эти данные подтвердили другие исследователи. В первых работах для подтверждения специфичности рисунка свечения в каждой хромосоме проводилась флуорометрия хромосом. Она окончательно доказала индивидуальность флуоресцентного профиля каждой хромосомы человека, но стало очевидным, что для идентификации достаточно визуального анализа. После сообщения O'Riordan с сотр. (1971) о том, что с наименьшим успехом различить все хромосомы человека можно, используя свободный от ипритной группировки акрихин, именно этот флуорохром стал чаще всего использоваться в исследованиях (В. А. Бенюш, 1973; Gan-



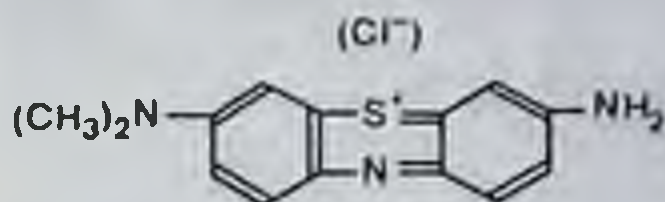
Акридиновый оранжевый



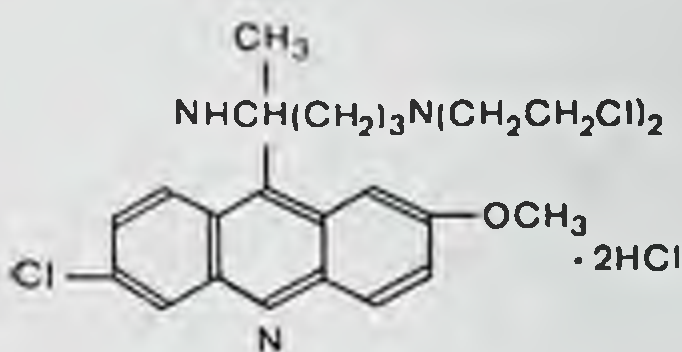
Метиленовый синий



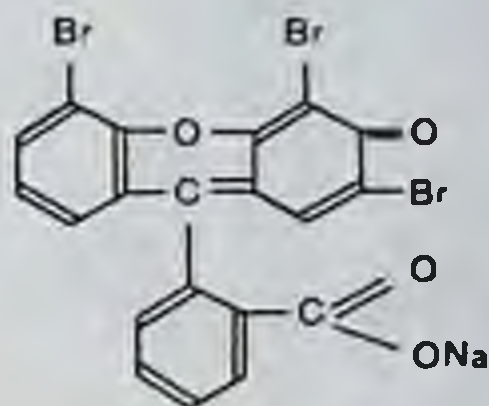
Акрихин



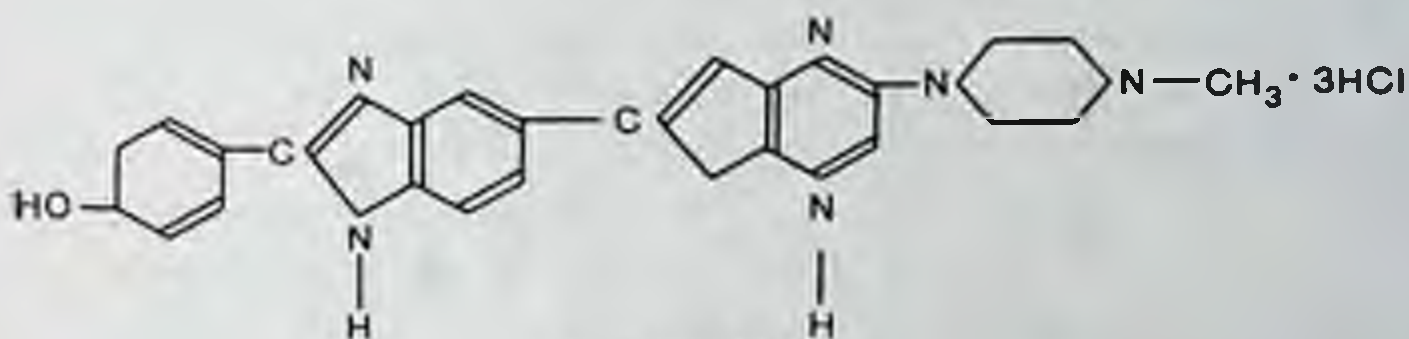
Азур А



Акрихин-иприт



Эозин Y



Hoechst 33258

пер, Evans, 1971; Manolov e. a., 1971; Mikelsaag e. a., 1973. и др.). В нашей лаборатории принята следующая легко выполнимая техника флуоресцентного анализа хромосом, отработанная В. А. Бенюшем (1973).

Рабочий раствор красителя — акрихина содержит 0,5—1,0 мг акрихина, 20 мл стандартного фосфатного или цитратно-фосфатного буфера (pH 6,5—7,0) и 80 мл воды. Для устранения гипотонического эффекта к раствору рекомендуется добавлять 0,2—0,4 г NaCl, однако при этом снижается яркость свечения и светорезистентность. Рабочий раствор сохраняется до 2—3 дней. Окраску производят при комнатной температуре не менее 3—5 мин. Препарат с остатками красителя (без высушивания или отмывания) накрывают покровным стеклом, так чтобы под ним не оставалось пузырьков воздуха, а краситель не попадал на наружную поверхность покровного стекла. Излишки жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Тщательно вытирают тыльную сторону предметного стекла. В этом виде препараты можно

анализировать, компенсируя высыхание жидкости путем помещения капли красителя у края покровного стекла. По окончании работы покровное стекло удаляют в воде, промывают препараты водой 1—2 мин, затем в смеси спирт — уксусная кислота — вода (1 : 1 : 1) 10—15 мин. В дальнейшем препараты можно использовать для других видов окраски или повторного флуорохромирования.

Анализ флуоресцентной окраски производят в падающем свете под микроскопами типа МЛ-2, МЛ-3 или МБИ, МББ при оснащении их люминесцентным осветителем ОСЛ-1. Для возбуждающего света используют светофильтр СС-4, в качестве запирающего — ЖС-18. Объективы: 90×1,3 (Л/МИ) (с применением нефлуоресцирующего масла) или 85×1,0 ВП с коррекцией на толщину покровного стекла. Этот объектив дает более резкое изображение. Фотосъемку производят на ролевуую пленку 24×36 мм типа КИ-3 или микрат-200. При общем увеличении в 500—600 раз экспозиция для КИ-3 составляет 6—10 с, для микрата-200—30—60 с. КИ-3 малокритична к выбору экспозиции и дает возможность получить несколько снимков с одного объекта. Изображение мягкое и слегка зернистое. Микрат-200 не допускает более чем 1,5-кратного отклонения от оптимальной экспозиции и позволяет сделать не более двух качественных снимков вследствие выцветания флуорохрома. Вместе с тем негатив на микрате-200 отличается высокой контрастностью, резкостью и мелкой зернистостью.

Картина дифференциальной флуоресценции нормальных хромосом после их обработки акрихином или акрихин-ипритом состоит в следующем (рис. 38).

Дифференциальность свечения складывается из чередования по длине хромосом сегментов разной яркости. Выделяют сегменты несветящиеся и сегменты со слабым, средним, интенсивным и очень ярким свечением. Хромосомы, не различимые по размерам и форме, сравнительно легко отличаются одна от другой по числу, размерам и расположению по-разному флуоресцирующих сегментов. От метафазы к метафазе меняется лишь четкость рисунка и общая яркость свечения. Постоянство рисунка свечения не абсолютно. У данного индивида его вариабельность зависит от длины (степени конденсации) хромосомы — чем хромосома длиннее, тем больше дополнительных сегментов. Кроме того, индивиды могут различаться между собой по размерам очень ярко светящихся сегментов, к которым относится околоцентромерный сегмент длинного плеча хромосом 3 и 4, короткие плечи акроцентрических хромосом и дистальная часть Y-хромосомы (Robinson, Buckton, 1971; Wahlström, 1971; Schnedl, 1973; Mikelsaag e. a., 1973, и др.). У данного индивида могут присутствовать не все эти сегменты. Вариабельность обоих признаков является выражением нормального полимор-



Рис. 38. Дифференциальное окрашивание нормальных хромосом человека (46, XY) акрихином. Объяснение в тексте.

физма хромосом человека по гетерохроматиновым районам, богатым, по-видимому, сателлитной ДНК 1 (см. с. 113 главы V). Полиморфизм особенно заметен, если различаются между собой гомологичные хромосомы.

Не описывая подробно, подчеркнем лишь отдельные моменты рисунка дифференциальной флуоресценции индивидуальных хромосом.

В аутосоме 1 длинное плечо отличается от короткого темным сегментом возле центromеры (район гетерохроматина) и четкими сегментами средней и сильной флуоресценции в остальной части плеча. В аутосоме 3 за короткое плечо принимают то, в котором дистальный слабо флуоресцирующий сегмент большего размера, а находящийся перед ним светящийся блок меньше, чем одинаковые по расположению сегменты другого плеча. Аутосома 4 отличается от аутосомы 5 узким слабо светящимся сегментом в проксимальной части длинного плеча, зато в хромосоме 5 слабее светит дистальный район длинного плеча. Аутосома 6, помимо своих размеров и формы, отличается от других С-хромосом большим слабо светящимся срединным районом в коротком плече. Аутосома 7 примечательна двумя крупными интенсивно светящимися сегментами, которые занимают почти все длинное плечо. Сходен рисунок длинного плеча и аутосомы 9, но оно легко отличается по нефлуоресцирующему крупному околоцентромерному району. Хромосомы 8 и 10 отличаются от других в группе тем, что их длинное плечо представлено тремя крупными блоками флуоресцирующего материала, между собой они различимы, помимо размеров и формы, меньшей четкостью дифференцировки длинного плеча у 8 и большими размерами проксимального светящегося блока в 10. Профиль свечения аутосом 11 и 12 очень характерен, что легко отличает их от других хромосом, различимы они и между собой (см. рис. 38).

Аутосома 13 в отличие от остальных в группе D имеет два крупных флуоресцирующих блока в дистальных двух третях длинного плеча. В аутосомах 14 и 15 сильнее флуоресцируют проксимальные половины плеч; между собой они различаются присутствием в 14 короткого активно светящегося сегмента в дистальной половине длинного плеча и деталями сегментации проксимальной его половины. Очень яркий материал в коротких плечах можно наблюдать в любой из 6 хромосом группы D. На рис. 38 по одной такой хромосоме имеется в парах 13 и 15. Ауто-

сомы 17 и 18 различаются ослабленной флуоресценцией проксимальной половины длинного плеча у 17, с узкой почти не светящейся полосой несколько проксимальнее середины плеча. В группе F самая слабо флуоресцирующая метацентрическая хромосома принята за аутосому 19; аутосома 20 отличается свечением средней интенсивности в коротком плече. G-хромосомы легко различимы благодаря интенсивному свечению проксимальных половин длинных плеч у хромосомы 21.

X-хромосома легко отличима от соответствующих аутосом наличием двух интенсивных по свечению крупных сегментов: в середине короткого и проксимальной половине длинного плеч. В женском наборе X-хромосомы не различимы. Для Y-хромосомы характерна необычно яркая флуоресценция дистальной части длинного плеча. Варибельность размеров Y-хромосомы определяется изменением количества именно этой части хромосомы. Яркая флуоресцирующая часть Y-хромосомы неоднородна и подразделяется на участки различной интенсивности свечения (Manolov e. a., 1971; Jalal e. a., 1974).

Представляют интерес еще два флуорохрома, испытанные на хромосомах человека и показавшие несколько иную флуоресценцию. Производное бензимидазола — препарат Хехст, особенно активно флуоресцирующий при взаимодействии с А—Т-нуклеотидами (см. с. 125 главы V), также окрашивает хромосомы человека неравномерно (Raposa, Nataгаjan, 1974), но четкость дифференциального свечения значительно хуже. В отличие от акрихина флуоресцируют гетерохроматиновые районы около центромер в хромосомах 1, 9 и 16. Очень близкую картину флуоресценции хромосом человека удается наблюдать при их окраске производным профлавина 2,7-ди-*t*-бутилпрофлавином (Disteche, Bontemps, 1974). И этот флуорохром, в отличие от акрихина, дает активное свечение гетерохроматиновых районов длинных плеч аутосом 1, 9 и 16. Оба названных флуорохрома не получили пока широкого применения в практической цитогенетике человека.

G-окрашиваемость

Вариант окраски хромосом по Гимзе, получивший это название, стал наиболее распространенным в цитогенетике человека ввиду сравнительно простой техники его выполнения и четкости неравномерного окрашивания всех хромосом. После первых методических разработок окраски этого вида последовали десятки модификаций. Общим, что объединяет все методики, является необходимость определенных постфиксационных воздействий на хромосомный препарат, без которых краситель Гимзы не дает избирательного окрашивания. Основные факторы такой обработки препаратов в настоящее время определены, однако остаются трудно учитываемыми какие-то дополнительные факторы, нередко определяющие успех в получении высококачественных препаратов.

В порядке нарастания интенсивности воздействий, применяющихся в технике G-окраски, все ее варианты удобно разделить на следующие группы (А. Ф. Захаров, 1973).

1. Инкубация препаратов в водных растворах солей, лишенных Ca^{2+} и Mg^{2+} , при температуре до $+37^\circ\text{C}$. Используют фосфатно-цитратные буферные растворы или растворы других солей. 2. Инкубация в стандартном солевом растворе (SSC) или в фосфатном буфере при повышенных температурах ($+60^\circ\text{C}$ и выше). Молярность и рН раствора, продолжительность и температура инкубации варьируют. 3. Инкубация в солевых растворах с добавлением протеолитических ферментов: трипсина, проназы и др. (Dutrillaux e. a., 1971; Finaz, de Grouchi, 1972). Концентрация растворов ферментов и продолжительность экспозиции с ними варьируют. 4. Воздействие на препараты растворяющими белок и хелирующими веществами типа мочевины, 2-меркаптоэтанола, додецилсульфата натрия. 5. Воздействие на препараты щелочными растворами с последующей тепловой инкубацией в растворе SSC или фосфатном буфере (Crossep, 1972). 6. Кратковременное кипячение препаратов с последующей тепловой инкубацией в растворе SSC.

Наиболее распространенной является техника окраски после предварительной кратковременной инкубации хромосомных препаратов в солевом растворе трипсина, первоначально предложенная Seabright (1971).

В наипростейшем варианте вся техника окраски может быть сведена к помещению препарата в фосфатно-цитратный буфер при рН 6,8, в который уже добавлены трипсин и краситель. Этот вариант применяется в нашей лаборатории. Препараты красят при температуре 25—27°C в течение 10—12 мин в растворе следующего состава: 1 мл стандартного красителя Гимзы, 49 мл фосфатного буфера, рН 6,8 и 0,1 мл 0,25% раствора трипсина.

Для получения четкой дифференцированности по длине всех хромосом и в достаточно большом числе метафазных пластинок рекомендуется учитывать ряд дополнительных условий. Среди них на первом месте — высокое качество препаратов. Оптимальный срок хранения препаратов перед окраской — от 5—7 дней до нескольких месяцев, причем отмечена зависимость между возрастом препарата и оптимальным временем инкубации его в растворе трипсина.

Продольная дифференцированность окрашивания, выявляемая при G-окраске, однотипна независимо от ее варианта. Хромосомы приобретают поперечную исчерченность благодаря чередованию интенсивно и слабо окрашенных или неокрашенных сегментов (рис. 39). Рисунок дифференцированности соответствует наблюдающемуся при Q-окраске, поэтому схема его едина для обоих типов окрашивания (см. рис. 37), и это освобождает нас от необходимости его комментировать, как это сделано для Q-рисунка (см. с. 134). Существенное отличие состоит в плотном окрашивании также и гетерохроматиновых крупных районов в хромосомах 1 и 16 и большинства центромерных районов. Гетерохроматиновый блок длинного плеча аутосомы 9 окрашивается непостоянно; не всегда интенсивно окрашивается и дистальная часть Y-хромосомы. Схема расположения сегментов, приведенная в сообщении Парижской конференции, представляет рисунок дифференцированности в его оптимальном выражении, который можно наблюдать на несильно сокращенных хромосомах при высоком качестве их окрашивания. Однако вне зависимости от этого G-окрашивание позволяет лучше выявить дифференцированность хромосом, чем Q-окрашивание.



Рис. 39. Дифференциальное окрашивание нормальных хромосом человека (46, XY) по G-технике. Объяснение в тексте.

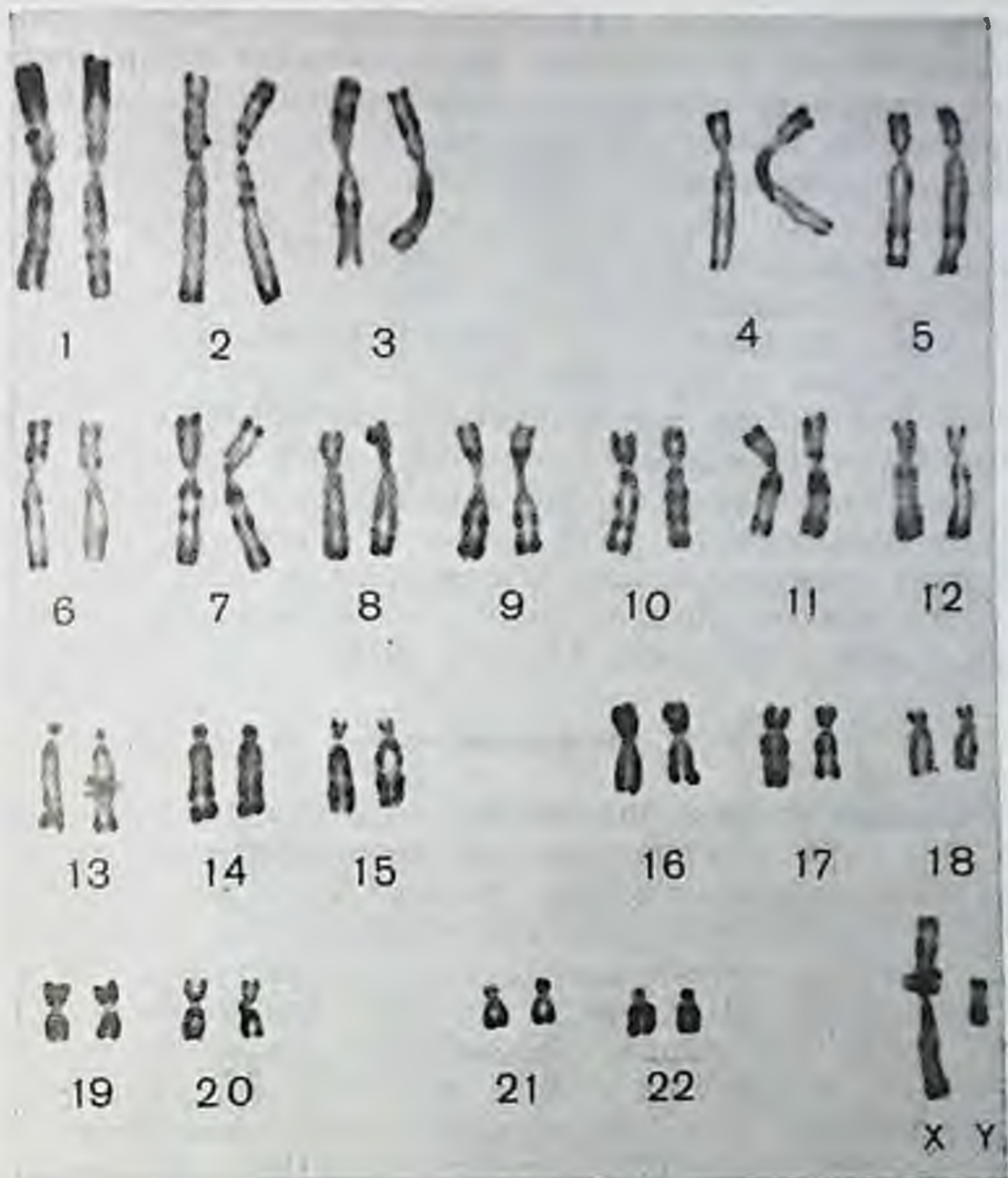


Рис. 40. Дифференциальное окрашивание нормальных хромосом человека (46, XY) по R-технике. Объяснение в тексте.

R-окрашиваемость

Окраска по методу Гимзы хромосомных препаратов, прошедших инкубацию при $+87^{\circ}\text{C}$, в течение 10—12 мин в фосфатном буфере рН 6,5, также приводит к неравномерному распределению красителя вдоль хромосом при слабой общей интенсивности окрашивания (Dutrillaux, Lejeune, 1971). Распределение окрашенных и неокрашенных сегментов оказалось обратным отражением того, что наблюдается при Q- и G-окрашивании. После усовершен-

ствования R-окраска находит все большее употребление в клинической цитогенетике. Возникновение R-окрашивания зависит не только от режима термической обработки препаратов, но и от pH и молярности инкубационной среды, продолжительности инкубации, возраста препаратов и других факторов, учитывая которые можно получать воспроизводимые результаты (Dutrillaux, Covic, 1974). На R-окрашенных хромосомах гетерохроматиновые районы, как центромерные и околоцентромерные, так и интерстициальные, не окрашены (рис. 40). Поэтому этот рисунок положительно коррелирует с индуцированной 5-бром-дезоксинуридином дифференциальной конденсацией, когда гетерохроматиновые районы также окрашиваются слабо (Вагановская и др., 1972). Общность рисунка в обоих случаях позволяет некоторым авторам относить окрашивание хромосом, обусловленное включением БДУ, к R-окрашиванию (Dutrillaux, Lejeune, 1975).

С-окрашиваемость

Основное условие получения С-окрашивания хромосом состоит в том, что разрушающее хромосомную структуру инкубационное воздействие должно быть достаточным, чтобы способность к окрашиванию сохранили лишь районы структурного гетерохроматина, особенно обогащенного сателлитной ДНК (см. главу VII). Для получения такого эффекта в основном используется кратковременная обработка препаратов в щелочной среде при комнатной температуре с последующей многочасовой инкубацией в растворе SSC при $+65^{\circ}\text{C}$ (Arrighi, Hsu, 1971). На результаты влияет ряд факторов, учет которых обеспечивает получение хороших препаратов (McKenzie, Lubs, 1973). Вместо едкого натра может быть использована гидроксид бария. Факторами предварительной обработки хромосом для индукции С-сегментов могут служить ДНК-аза и продолжительное воздействие теми агентами, которые обуславливают G-окрашивание, например трипсином.

В нашей лаборатории Г. П. Леликовой отработана следующая процедура С-окраски, стабильно дающая хорошее окрашивание гетерохроматина. Сначала препараты выдерживают в течение 10 мин в 0,2 н. растворе HCl. После трехкратного отмывания в дистиллированной воде по 5 мин препараты погружают в 0,07 н. раствор NaOH на 30 с при комнатной температуре. Следует трехкратное отмывание в растворе 2XSSC по 5—10 мин и инкубация в растворе 2XSSC при $+65^{\circ}\text{C}$ в течение 18—24 ч. Затем препараты отмывают в трех

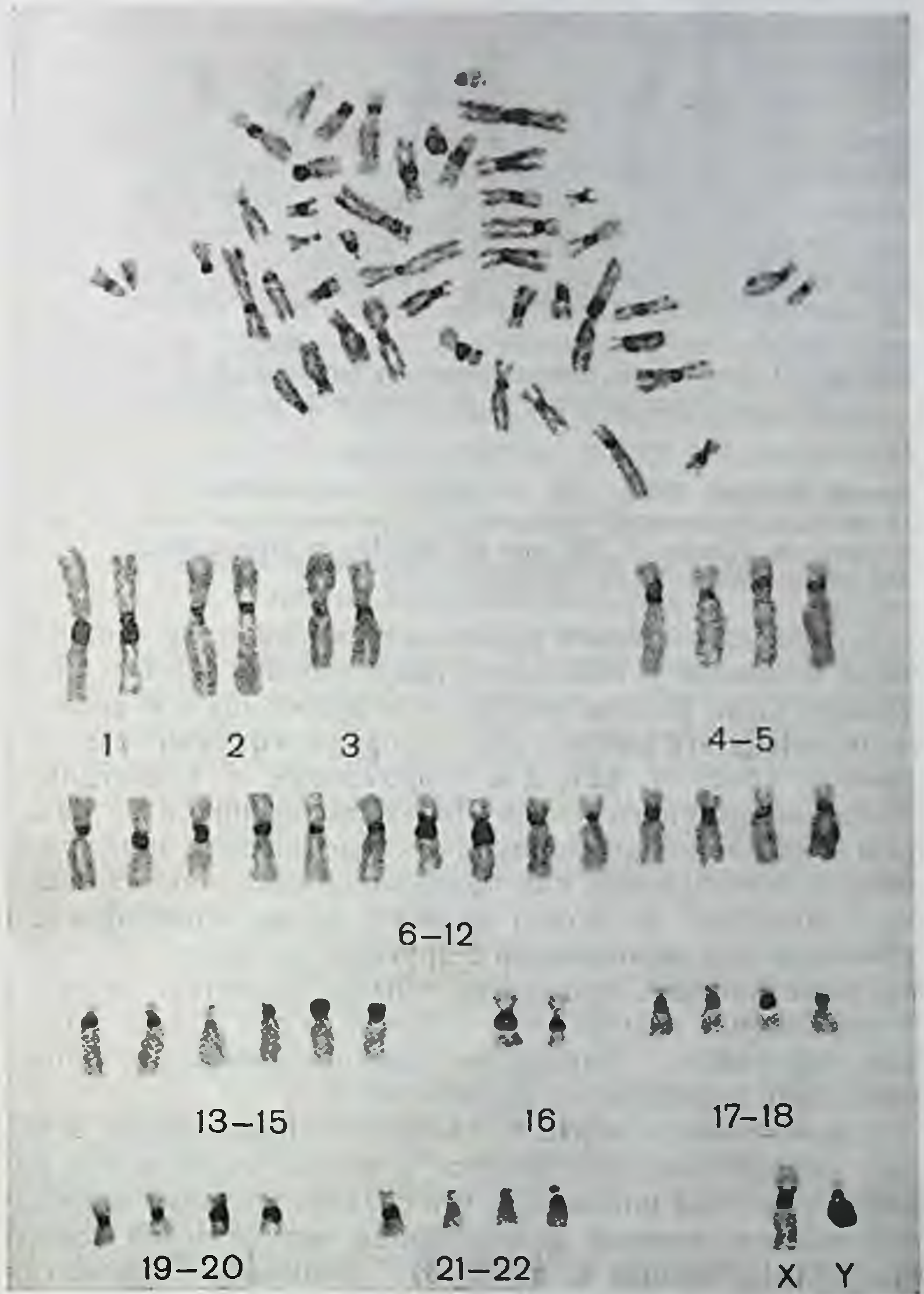


Рис. 41. Дифференциальное окрашивание нормальных хромосом человека (46, XY) по С-технике. Описание в тексте.



Рис. 42. Полиморфизм гомологичных хромосом 1, 9 и 16 по размерам околоцентромерного гетерохроматина (С-окраска).

сменах этанола (70%, 90% и 100%) и окрашивают в течение 7—10 мин при комнатной температуре в растворе красителя Гимзы на фосфатном буфере (1 : 30) при рН 6,8. После споласкивания проточной водой препараты высушивают.

С-окраска выявляет районы структурного гетерохроматина, наиболее устойчивые к повреждению химическими и физическими факторами. Во всех аутосомах и X-хромосоме человека эти районы локализованы в окрестности центромеры (рис. 41, 42), а в Y-хромосоме — в дистальной половине длинного плеча. По расположению и по размерам этих блоков индивидуальные хромосомы, за исключением 1, 9 и 16, резко, как правило, не различаются, поэтому С-окраска не может служить целям идентификации хромосом вне комбинации с другими методами. Наиболее крупные блоки С-хроматина обычно имеются, не считая Y-хромосомы, в аутосомах 1, 9 и 16, в области их вторичных перетяжек. Самым мелким центромерным блоком обладают Y-хромосома и аутосома 2.

Замечательная черта С-хроматина, выявленная в первых же работах, заключается в вариабельности его размеров у разных индивидов, что создает широкий нормальный наследственный полиморфизм человеческой популяции (Craig-Holmes e. a., 1973). Величина С-хроматина для данной хромосомы является наследственным качеством, поэтому различия родителей по С-хроматину той или иной хромосомы отчетливо проявляются у ребенка в форме гетероморфизма гомологов (рис. 42). Наиболее демонстративны в этом отношении изменения в размерах С-хро-

матина аутосом 1, 9 и 16. Неоднократно описанные ранее индивиды с необычным удлинением аутосом 1 и 9 за счет увеличения зоны околоцентромерного гетерохроматина (см. с. 36 главы II) оказались лишь наиболее яркими случаями наследственной вариабельности в количестве С-хроматина (Holzer, Rosenkranz, 1972; Kim, 1974; Madan, Bobrow, 1974). Очень часто варьирует в своих размерах С-хроматин в акроцентрических хромосомах (Craig-Holmes e. a., 1973). Мы не говорим здесь о полиморфизме С-хроматина длинного плеча Y-хромосомы, который хорошо выявляется с помощью окраски акрихином (см. с. 135). Можно полагать, что не меньшую вариабельность может испытывать С-хроматин любой другой хромосомы, и лишь малые его размеры в сочетании с неидентифицированностью большинства хромосом на С-окрашенных препаратах препятствуют учету полиморфизма по всем хромосомам.

КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ И ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОКРАСОК

Каждый из описанных выше методов имеет свои положительные и отрицательные стороны в техническом отношении, каждый из них вскрывает несколько разные стороны продольной организации хромосом. Природа дифференциальной окрашиваемости хромосом будет рассмотрена в следующей главе. Здесь же подчеркнем, что окрашиваемость является как бы интегральным отражением продольной дифференцированности хромосом и по химическим особенностям, и по структуре, и по функциональному состоянию. В зависимости от применяющегося красителя и особенностей воздействия на хромосомы до окраски выявляются разные грани этой дифференцированности. Естественным желанием является, во-первых, использование, в конкретных случаях хромосомного анализа, особенно при неясном характере хромосомной аномалии, нескольких методов, во-вторых, дальнейшая разработка методик окрасок.

В практике цитогенетического обследования индивидов с хромосомными отклонениями все более широко используется комплекс методов, который обычно включает Q-, G- (или R-) и С-окраски. Взаимное дополнение методов в их разрешающей способности позволяет в настоящее время выяснять происхождение сложных структурных

хромосомных перестроек (Fujita e. a., 1974, и др.). Предлагаются процедуры, выполнение которых обеспечивает последовательное проведение разных окрасок на одних и тех же препаратах, и это существенно повышает точность хромосомного анализа (Dutrillaux, Covic, 1974).

Предложенная Парижским совещанием классификация методов дифференциальной окраски является условной, и опыт дальнейших модификаций методов хорошо это показывает. В нескольких работах обнаружено, что на хромосомных препаратах, подготовленных по G-технике, но покрашенных акрихином, не флуоресцирующие при обычной Q-окраске гетерохроматиновые районы приобретают яркое свечение (de la Chapelle e. a., 1971, 1973; Evans e. a., 1971). В этом случае краситель Гимзы и акрихин идентично выявляют неоднородность хромосомной структуры. Для выявления C-хроматина основное значение имеет обработка препаратов по C-технике, а не краситель. На таких препаратах C-блоки выявляются и при окраске флуорохромами (Raposa, Natagajan, 1974).

Особенный интерес вызывают исследования, в которых для избирательной окраски использован акридиновый оранжевый. На препаратах, не испытанных после их приготовления каких-либо воздействий, акридиновый оранжевый дает равномерное свечение по длине хромосом. Обработка препаратов по G- или по R-технике приводит к одному результату (Couturier e. a., 1973; Bobrow, Madan, 1973). G-положительные сегменты флуоресцируют в красной зоне спектра, G-отрицательные — в зеленой. На черно-белой фотографии хромосомы имеют R-рисунок. И в этом случае, хотя применен флуорохром, обнаруживаемая картина соответствует выявляемой по Гимзе дифференцированности в R-варианте. После процедур, применяемых для C-окраски, акридиновый оранжевый также дает на хромосомах дифференциальное свечение, при котором C-хроматин отличается от остального хроматина яркой зеленой флуоресценцией (de la Chapelle e. a., 1973; Comings, 1973). Суть выявляемой неоднородности остается характерной для C-окрашивания.

Наблюдение за динамикой развития избирательного окрашивания хромосом по Гимзе в разных ее вариантах обнаруживает два интересных факта. Во-первых, на одних и тех же препаратах, варьируя определенным образом условия их обработки до окраски, можно получить последовательную смену разных типов окрашивания.

Тщательное изучение этого процесса проведено Dutrillaux и Covic (1974). Они установили наиболее очевидное участие в возникновении избирательного окрашивания рН и концентрации ионов, температуры инкубационной среды, времени инкубации и возраста препаратов. Тип окрашивания зависит от степени разрушения хромосомной структуры, в порядке нарастания его появляются, сменяя друг друга, G-, R- и C-окрашивание. C-окрашиванию предшествует такой этап метаморфозы R-рисунка, когда способность к окрашиванию сохраняют лишь теломерные районы хромосом (T-окраска). Эти и подобные им наблюдения имеют очень важное значение, свидетельствуя о глубокой расчлененности каждой хромосомы на районы, резко различающиеся между собой по особенностям своей организации, но в то же время во всех или большинстве хромосом имеются сходные районы, нередко однотипно расположенные (C-районы, T-районы).

Второй факт заключается в том, что реакция на воздействия и окраску, казалось бы, однотипных районов разных хромосом не одинакова. Достоверные сведения по этому вопросу уже начинают появляться в литературе, главным образом в отношении C-хроматина. Сущность их заключается в том, что в разных хромосомах оптимальные условия для окраски C-хроматина различны (Kim, 1974). Окраска акридиновым оранжевым также позволяет выявить определенную последовательность, в которой C-хроматин приобретает красное свечение: при щелочной обработке первым начинает флуоресцировать в красной области хроматин аутосом 1, 9, 16, последним — гетерохроматин Y-хромосомы (de la Chapelle e. a., 1973).

Из этих фактов следует, что гетерохроматин разных хромосом глубоко индивидуален, и с помощью красящих реакций мы лишь начинаем нащупывать эту индивидуальность.

Специфичностью гетерохроматина индивидуальных хромосом можно объяснить найденные чисто эмпирически возможности избирательного окрашивания некоторых участков отдельных хромосом. Так называемая T-окраска (Dutrillaux, 1973) достигается, если термическая обработка препаратов по R-технике проводится дольше положенного времени или при более кислом рН (Dutrillaux, Covic, 1974). Хромосомы сохраняют способность окрашиваться красителем Гимзы или акридино-



Рис. 43. Дифференциальное окрашивание нормальных хромосом человека (46, XY) акридиновым оранжевым по Т-технике. Описание в тексте.

вым оранжевым лишь в немногих районах, особенно в теломерных. Разные хромосомы реагируют на такую обработку по-разному (рис. 43).

Eiberg (1974) описал вариант С-окраски, названный им S_d -окраска, когда во всех хромосомах выявляются только центромерные районы, околоцентромерный гетерохроматин и гетерохроматин длинного плеча Y-хромосомы не окрашивается.



Рис. 44. Избирательное окрашивание красителем Гимзы околоцентромерного гетерохроматина хромосомы 9 (G11-техника). Перicen-трическая инверсия в одной из хромосом (указано стрелкой) (ори-гинал от R. Gagne).

При повышении щелочности инкубационной среды до рН 11 и выше хромосомы теряют способность к окрашиванию по Гимзе даже в большинстве своих околоцентромерных районов. На этом основана так называемая G-11 техника, позволяющая избирательно окрашивать С-хроматин аутосомы 9 (Gagne, Laberge, 1972; Bobrow e. a., 1972). При рН 11 частично сохраняется окрашивание С-хроматина хромосом 1, 5, 10 и акроцентрических хромосом, в области рН 11,3—11,9 окрашивается только гетерохроматин хромосомы 9 (рис. 44). В несколько иных условиях предварительной термической обработки в растворе хлорида натрия и хлорида цезия при окраске красителем Лейшмана может избирательно окрашиваться С-хроматин аутосомы 1 (Gegaeds, Pearson, 1973). Последовательная обработка препаратов в растворе NaCl при двух разных режимах температуры и рН может обеспечить избирательную окраску красителем Гимзы Y-хромосомы (Dallapiccola, Ricci, 1975).

Возможно избирательное окрашивание хроматина спутничных районов хромосом. Одна из методик (N-окраска) включает предварительную экстракцию из хромосом фиксированных препаратов нуклеиновых кислот и гистонов и окраску красителем Гимзы (Matsui, Sasaki, 1973). Можно предвидеть, что мы находимся лишь на пороге разработки подходов к выявлению с помощью окрасок и цитохимических тестов индивидуальных хромосом и их специфических районов.

ПРИМЕНЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ОКРАСОК В КЛИНИЧЕСКОЙ ЦИТОГЕНЕТИКЕ

Разработка разных методов дифференциальной окраски хромосом человека в немалой степени стимулировалась острой потребностью дальнейшего прогресса в идентификации хромосом и их районов. Вполне естественно, что эти методы начали сразу же использоваться для распознавания происхождения аномальных хромосом. Уже в 1970 г. руководимый Caspersson коллектив успешно применил окраску акрихин-ипритом для идентификации лишней G-хромосомы при болезни Дауна, Ph-хромосомы при хроническом миелоидном лейкозе, делетированной В-хромосомы при синдроме «кошачьего крика» («cri-du-chat») и др. (Caspersson, Zech, 1972). Первые клинико-цитогенетические исследования с использованием новых методов подытожены в нескольких обзорах (А. Ф. Захаров, 1973; Lejeune, 1973; Dutrillaux, Lejeune, 1975).

С тех пор появились новые сотни публикаций, включающих как результаты анализа ряда сходных хромосомных аномалий, так и описания уникальных случаев хромосомной патологии. Трудно переоценить тот вклад, который новые методы вносят в уточнение хромосомных вариантов при уже установленных клинических синдромах и в открытие новых клинико-цитогенетических параллелей, в классификацию хромосомных болезней. Разработанные в 1971 г. (Paris Conference, 1971) и дополненные позже (Paris Conference, 1971; Supplement, 1975) единая терминология по методам окраски, стандартизованная схема линейной дифференцированности нормальных хромосом, удобная система обозначения каждого сегмента и рекомендации по обозначению перестроек хромосом — все это значительно облегчило

клинико-цитогенетическое обследование человека на новой основе. Информация в этой области настолько обширна, что сейчас не представляется возможным ее обобщить, да это и не входит в нашу задачу. Выделим основные достижения методически обновленной медицинской цитогенетики, намеренно ограничивая до минимума количество ссылок на оригинальные работы.

1. По-новому стала выглядеть «норма» хромосомного набора человека: открылся не подозревавшийся ранее широкий нормальный хромосомный полиморфизм по особенностям строения хромосом (McKenzie, Lubs, 1975; Müller e. a., 1975). Мы уже упоминали о той части этого полиморфизма, которая обусловлена вариабельностью размеров гетерохроматина и вскрывается с помощью C- и Q-окрасок (см. с. 132 и 142). Подчеркнем здесь, что при каких-то пока невыясненных обстоятельствах изменения в количестве структурного гетерохроматина могут сопровождаться аномалиями развития, т. е. выходить за границы нормального полиморфизма (Nielsen e. a., 1974). Определенный полиморфизм создается внутрихромосомными и межхромосомными сбалансированными структурными перестройками, которые стало возможно выявлять, зная линейную структуру участков хромосом. Многократны описания перичентрических инверсий в аутосоме 9 (см. рис. 44). По данным de la Chapelle и сотр. (1974), частота таких инверсий в финской популяции составляет более 1%, гетерозиготы по ним фенотипически нормальны. Накапливаются сообщения и о наследуемых случаях перичентрических инверсий по другим хромосомам (de la Chapelle e. a., 1974). Мы не говорим здесь о многочисленных описаниях фенотипически нормальных носителей сбалансированных транслокаций, часть из которых реципрокны и вовлекают различные аутосомы и гоносомы, другая часть является робертсоновскими транслокациями акроцентрических хромосом.

2. Окончательно установлено, нарушения каких хромосом обуславливают возникновение ранее известных хромосомных синдромов. Десятки обследований с применением новых методов подтвердили обусловленность болезни Дауна трисомией всегда одной и той же хромосомы — 21, синдрома Патау — трисомией 13, синдрома Эдвардса — трисомией 18. Подтверждено, что делеции коротких плеч аутосом 4 и 5 создают четко различающиеся синдромы 4p— и 5p—. Более точными стали опи-

сания хромосомных делеций при синдромах 18p— и 18q—. Подавляющая часть делеций длинного плеча D-хромосом оказалась, как и предполагали, случаями 13q—. Расширилось число точно идентифицированных случаев частичной трисомии 18. Предположение о существовании двух форм G-делеций подтверждено. Одна из них, «антимонголизм», действительно оказалась формой частичной моносомии 21.

Новые методы значительно ускорили накопление сведений по X/X и X/аутосомным транслокациям, что способствовало разработке представления о центре инактивации в генетически инактивированной X-хромосоме человека (см. с. 88 главы IV).

3. Описаны новые хромосомные синдромы, которые либо не были известны, либо предполагались без достаточной фактической базы (Lewandowski, Yunis, 1975). Среди них: а) синдром трисомии 8 (Caspersson e. a., 1972); б) синдром полной или частичной трисомии 9 (Schinzel e. a., 1974), частичной моносомии 9 (Alfi e. a., 1976); в) синдром частичной трисомии 10 (de Grouchi e. a., 1972; Yunis e. a., 1976); г) синдром частичной или полной трисомии 22 (Bühler e. a., 1972;); д) частичные трисомии по аутосоме 14 (Pfeiffer e. a., 1973) и 15 (Rethore e. a., 1973); е) трисомия по короткому плечу 4 (синдром 4p+) и по длинному плечу 4 (Rethore e. a., 1974).

4. Новые методы открыли широкие возможности для диагностики сбалансированных транслокаций и установления характера хромосомных аномалий в потомстве их носителей (рис. 45). Уже сейчас установлено, что такие носители — не редкое явление, причем описаны транслокации, самые разнообразные в отношении вовлеченных хромосом, их плеч и размеров обменивающихся участков. Эти случаи представляют исключительный интерес, поскольку в потомстве оказываются обладатели частичных моносомий или трисомий по разным хромосомам и их сегментам. Для примера укажем на случаи обследования смесей с реципрокными сбалансированными транслокациями 5/13 (Carpentier e. a., 1972), 10/12 (de Grouchi e. a., 1972), 15/21 (Rethore e. a., 1973). Клинико-цитогенетический анализ потомства носителей подобных транслокаций приводит к обнаружению новых и разнообразных форм частичной моносомии или трисомии. Пока большинство таких случаев уникальны по типу изме-



Рис. 45. Примеры структурных перестроек хромосом, идентифицируемых по G-окрашиванию. Робертсоновские транслокации 13/13 (а) и 13/15 (б), в — транслокация между X-хромосомами: 47, X, t (X; X) (q27; q27).

нений, однако со временем можно рассчитывать на открытие все новых клинико-цитогенетических синдромов, по мере того как будут накапливаться аналогичные случаи перестроек. Некоторые указанные выше новые синдромы были открыты именно таким путем.

5. Благодаря новым методическим возможностям быстро расширяется коллекция структурных аномалий, происходящих в пределах одной хромосомы и включающих терминальные и интерстициальные делеции, инверсии, вставки, образование изохромосом, дицентрических, кольцевых хромосом. Соответствующие наблюдения накапливаются по каждой хромосоме, особенно многочисленны они для Y-хромосомы. Имеются примеры обнаружения весьма малых структурных делеций или вставок (Funderburk, Scandall, 1974). В равной мере неизмеримо углубились возможности обнаружения транслокаций мелких сегментов, примером чего может служить перестройка аутосомы 22 при хроническом миелоидном лейкозе (Rowley, 1973).

6. Новый стимул к дальнейшему развитию получила цитогенетика злокачественных новообразований. Стало

более достижимым разрешением одной из задач этой области цитогенетики: выяснение возможности специфичности хромосомных отклонений при той или иной форме рака. За короткое время получены убедительные свидетельства предпочтительного вовлечения определенных хромосом в изменения при определенных видах злокачественных опухолей человека (Е. В. Флейшман, 1975).

7. В мутагенезе давняя проблема избирательного повреждения хромосом и их участков мутагенами начинает решаться по-новому, так как созданы условия для отнесения зон распределения повреждений не к условным единицам длины хромосомы, а к известной карте ее структурно-функциональной дифференцированности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность хромосом человека к избирательному окрашиванию по длине вооружила исследователей эффективным средством обнаружения продольной дифференцированности метафазной хромосомы. Такое окрашивание присуще всем хромосомам человека и может быть получено с помощью как флуоресцирующих красителей (Q-окраска) так и красителя Гимзы (G- и R-окраски). По числу, размерам и положению сегментов хромосомы глубоко индивидуальны. Это обеспечивает надежную идентификацию всех хромосом человека в нормальном наборе и помогает расшифровке происхождения численно и структурно измененных хромосом.

Важным условием неравномерного окрашивания участков хромосом является предварительное воздействие на хромосомный препарат растворами определенных солей при определенных рН и температуре, а также другими веществами, влияющими на хромосомные белки. Изменяя эти условия, можно получить разную реакцию одних и тех же районов хромосомы на краситель. На этом явлении основаны избирательные окраски околоцентромерных и теломерных районов хромосомы (С- и Т-окраски).

Применение дифференциальных окрасок в медицинской цитогенетике играет исключительную роль в быстром прогрессе разных ее областей. В дифференциальной окрашиваемости проявляются не случайные и второстепенные, а постоянные, фундаментальные элементы хромосомной организации.

ЕДИНСТВО РАЗНЫХ СТОРОН ЛИНЕЙНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТИ ХРОМОСОМЫ ЭУКАРИОТОВ

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих главах излагались разные характеристики линейной дифференцированности хромосом человека, проявляющиеся структурно и функционально, выражающиеся в цитологических, генетических или молекулярных понятиях. Хорошо известно, что структура и функция любой биологической системы взаимосвязаны и взаимообусловлены. Как реализуется это положение в отношении хромосомы?

Уже при изложении отдельных характеристик линейной организации хромосомы мы не могли не касаться тех или иных проявлений их взаимосвязи, поскольку разделение этих характеристик весьма условно. Настоящая глава специально посвящена вопросам взаимосвязи разных сторон хромосомной организации. Излагаемые здесь факты и представления выходят за рамки специфики хромосом человека, они касаются хромосом эукариотов в целом. Поэтому привлечены работы, выполненные на других биологических видах.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОСТОЯНИЯ КОНДЕНСАЦИИ, ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ВРЕМЕНИ РЕПРОДУКЦИИ

Тесная взаимосвязь структурно-функциональных характеристик хромосомы, которые названы в этом разделе, сейчас рассматривается как твердо установленный факт. Многочисленные и многообразные наблюдения свидетельствуют, что конденсированный хроматин не обладает генетической (транскрипционной) активностью, а репликация ДНК осуществляется в нем на более поздних

этапах S-периода клеточного цикла. Что является первичным, а что вторичным, производным в этой взаимосвязи?

Если такой вопрос поставить по отношению к структурному гетерохроматину, его генетическая инертность является результатом отсутствия структурных, менделирующих генов, результатом неспособности транскрибировать информационную РНК. Оба эти свойства объяснимы тем, что ДНК такого гетерохроматина — это ДНК с многократными копиями очень простых последовательностей нуклеотидов (см. главу V).

В отношении факультативного гетерохроматина высказано мнение, что генетическая инактивация предшествует хромосомной конденсации (Prescott, 1970; Comings, 1972). Это мнение основывается на сохранении генетической инертности у X-хромосомы в клетках, где такая хромосома не обнаруживается в форме тельца Барра. Такой довод не является состоятельным в свете уже упоминавшихся данных о том, что отсутствие плотной глыбки хроматина не означает полной деконденсации составляющего ее хромосомного материала (Yunis, Yasmineh, 1972). Более логично предположить, что первична конденсация, компактизация хромосомной нити, и это препятствует осуществлению ДНК матричной активности в обоих ее видах: транскрипции РНК и репликации ДНК (Priest, 1968). Структурное состояние хроматина выступает в этом случае как самый общий и неспецифический механизм регуляции матричной активности ДНК, который оперирует на уровне крупных районов хромосом, целых хромосом и их совокупностей. Современная экспериментальная физиология клеточного ядра, использующая трансплантацию ядер, гибридизацию соматических клеток и воздействие на хроматин полианионами или поликатионами, представляет много данных в пользу этой точки зрения.

Исторически факты и представления о корреляции трех основных функций хромосомы складывались так, что вначале была установлена связь состояния конденсации с генетической активностью хромосомы. В пользу этой связи свидетельствует, во-первых, обедненность конденсированных в интерфазном ядре гетерохроматиновых районов менделирующими генами.

Следующая группа фактов, свидетельствующих о генетической инертности районов структурного гетерохроматина, объединяет многочисленные случаи изменения

его количества без заметных отрицательных фенотипических последствий для клетки или организма. В главе III были систематизированы соответствующие данные по хромосомному дисбалансу у человека.

Генетическая инертность структурного гетерохроматина доказывается еще одним феноменом — эффектом положения (см. с. 87 главы IV). Цитогенетический анализ этого явления показал, что обязательным условием эффекта положения должно быть участие в транслокации гетерохроматиновых районов. Хотя не исключено, что генетическая активность транслоцируемого эухроматинового сегмента частично может меняться из-за утери некоторого количества материала, основной эффект связан с гетерохроматинизацией транслоцированных генов.

Обширные сведения о тесной корреляции между конденсированным состоянием и утратой генетической активности получены при изучении явления «компенсации дозы генов» (см. главу III). У человека это явление выражается в генетической инактивации в соматических клетках всех X-хромосом, число которых превышает единицу (нормальные соматические клетки женщины, X-полисомия). Установлено, что инактивированные X-хромосомы гетерохроматинизируются. В раннем эмбриогенезе обнаружено довольно синхронное становление и гетерохроматинизации, и инактивации X-хромосомы.

В гаметогенезе можно найти дополнительные подтверждения связи двух обсуждаемых явлений. В половом биваленте XY у мыши, крысы и других млекопитающих обе хромосомы гетерохроматинизированы и неактивны в синтезе РНК. По-видимому, инактивация обеих гоносом в мужском гаметогенезе — эволюционно более древний механизм, на котором развился механизм компенсации дозы генов между полами путем инактивации второй X-хромосомы у самок (Lyon, 1974). В оогенезе обе X-хромосомы эухроматичны и активны, что обеспечивает беспрепятственное осуществление между ними генетической рекомбинации (Ohno, 1967; Gartler e. a., 1973).

После того как были найдены подходы к характеристике функционального состояния хроматина со стороны его репликационной активности, на хромосомах кузнечика и ржи было сделано важное наблюдение: гетерохроматин и эухроматин четко различаются по времени репликации ДНК в митотическом цикле, причем первый проходит репродукцию позднее, чем второй (Lima-de-Faria, 1959). Со

времени этой первой работы сравнительному анализу времени репродукции обоих типов хроматина с привлечением разнообразных видов животных и растений было посвящено большое количество работ (А. А. Прокофьева-Бельговская, 1969, 1970, 1971; Prescott, 1970, и др.). Особенно удобной моделью для сравнения послужила генетически инактивированная X-хромосома в соматических клетках самок млекопитающих, поскольку большие размеры блоков содержащегося в ней гетерохроматина хорошо соответствовали разрешающей способности метода радиоавтографии. Запаздывание гетерохроматинизированной X-хромосомы в репликации ДНК оказалось правилом для всех исследованных видов (А. Ф. Захаров, 1968; А. А. Прокофьева-Бельговская, 1970; Ohno, 1967). На человеке это правило было подтверждено для разнообразных случаев численных и структурных аномалий в системе X-хромосом (см. главу IV).

Определенную черту под подобные исследования подвели Lima-de-Faria и Jaworska (1968). Авторы в своем анализе данных литературы начали с их строгого отбора. Были рассмотрены лишь такие сопоставления, в которых радиоавтографическому исследованию подвергались те же ткани и на той же стадии развития, для которых была четко установлена локализация гетерохроматина в хромосомном наборе цитологическими методами. В результате в списке оказалось 4 вида растений, 4 вида насекомых и 9 видов млекопитающих. На всех без исключения видах был получен один и тот же результат: в гетерохроматиновых районах репликация ДНК происходит позднее, чем в эухроматиновых. Таким образом, можно принять, что позднее включение метки в хромосому может служить индикатором генетически активных и неактивных гетерохроматиновых сегментов в метафазной хромосоме.

Проведенные в последние годы радиоавтографические исследования репликации ДНК в X-хромосомах ряда видов грызунов дают основание думать, что между структурным и факультативным гетерохроматином может существовать некоторое различие во времени репликации. Речь идет о более позднем ее окончании в первом по сравнению со вторым, однако наблюдений пока недостаточно, чтобы рассматривать эти данные как проявления закономерности. На этих же объектах была обнаружена большая интенсивность синтеза ДНК в структурном гетеро-

хроматине сравнительно с другими видами хроматина, что, скорее всего, обусловлено большой синхронностью синтеза ДНК в разных репликациях.

Сейчас возникает важная задача более углубленного проникновения в описанные корреляции. Разнообразие типов гетерохроматина по ряду характеристик ставит, например, проблему взаимосвязи между поведением хроматина в репродукционном цикле и другими его характеристиками.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТИ ХРОМОСОМ

Подходя к вопросу о химических различиях эухроматина и гетерохроматина, можно предвидеть, что такие различия следовало бы искать как на молекулярном уровне, имея в виду первичный химический состав ДНП, так и на уровне надмолекулярном, обращаясь к физико-химическим механизмам, обеспечивающим различия обоих типов хроматина на самой высокой ступени их организации. Тот факт, что любой район хромосомы может быть выключен из генетического функционирования, приобретая на цитологическом уровне характеристики гетерохроматина, дает основание полагать, что немаловажное значение в возникновении структурных и функциональных различий между гетерохроматином и эухроматином имеют именно биохимические механизмы репрессии и дерепрессии матричной активности ДНК. В чем состоят эти механизмы?

Метаболическая активность ДНК—это преимущественно ее матричная активность, связана ли она с транскрипцией генетической информации или с репликацией ДНК. Многочисленные биохимические и другие исследования показывают, что зависимость между конденсацией хромосомной нити и уменьшением или прекращением синтеза мРНК является важнейшей характеристикой хромосом на любом уровне, от молекулярного до микроскопического. Наибольшую степень конденсации хромосомы приобретают в метафазе, а именно метафазные хромосомы полностью утрачивают способность к синтезу РНК, касается ли это митоза или мейоза. Интерфазное ядро имеет уменьшенную способность к синтезу РНК в участках гетерохроматина, что отмечено по сниженному включению ^3H -уридина в эти участки как в опытах на интактных клетках, так и на изолированном хроматине.

Возникает вопрос о биохимической природе тех процессов, которые обуславливают конденсацию хромосомной нити и связанную с этим репрессию матричной активности ДНК. Идея о возможной роли гистонов как репрессоров генетической активности после широкой экспериментальной проверки потеряла свою первоначальную привлекательность. В настоящее время этот вопрос продолжает дискутироваться, но ответ на него не столь однозначен, как предполагалось вначале (Bonner e. a., 1968; Frenster, 1969; Johnson e. a., 1974). Биохимические исследования роли гистонов в регуляции активности ДНК основаны на методе отдельного получения из клеточных ядер фракций гетерохроматина и эухроматина и определении их активности в синтезе мРНК в бесклеточных системах *in vitro*. Гетерохроматин оказался значительно менее активен в качестве матрицы для синтеза мРНК, чем эухроматин. Роль репрессора выполняли гистоновые белки, поскольку их удаление резко повышало синтез РНК. Добавление гистонов к препаратам ДНК, приводившее к реконструкции нуклеогистона, сопровождалось угнетением продукции мРНК.

Эти данные, несомненно показывающие, что гистоны имеют отношение к угнетению матричной функции ДНК, поставили вопрос о том, происходит ли такое угнетение в силу неспецифической способности гистонов к комплексообразованию с отрицательно заряженными биополимерами или же они действительно функционируют в клетке как специфические репрессоры. Упрочилось мнение, что гистоны действуют как неспецифические репрессоры.

Один из доводов в пользу этой точки зрения состоит в сходстве гетерохроматина и эухроматина в содержании общих гистонов и их двух основных типов — богатых аргинином и богатых лизином. В то же время накоплено немало фактов в пользу участия гистонов в неспецифической репрессии, которую они выполняют, по-видимому, вовлекаясь в механизмы конденсации хроматина путем таких реакций, как ацетилирование и фосфорилирование. Центр проблемы специфической регуляции генетической (матричной) активности переносится все более на участие специфических дерепрессоров. Роль таких дерепрессоров могли бы выполнять ядерные полианионы, в особенности молекулы РНК (Frenster, 1965, 1969) или негистоновых белков (А. Я. Варшавский, 1976).

Если биохимические механизмы гетерохроматинизации еще предстоит вскрыть, то на вопрос о различии эухроматина и гетерохроматина по первичной химической структуре составляющих их ДНК можно ответить определенно. В первых же экспериментальных попытках сопоставить гетерохроматин и эухроматин по составу нуклеотидных последовательностей ДНК обнаружилось, что структурный гетерохроматин служит основным носителем ДНК с повторяющимися последовательностями. В настоящее время это положение кажется достаточно обоснованным большим числом фактов, полученных при изучении многих десятков видов растительных и животных организмов (Bostock, 1971; Comings, 1972; Flamm, 1972; Rae, 1972). Эти факты получены разными методами.

Первые исследования по локализации разных классов ДНК в хроматине клеточного ядра были проведены путем выделения фракций плотного и диффузного хроматина и определения особенностей их ДНК. Раздельный анализ на содержание сателлитной ДНК аутосомного гетерохроматина и эухроматина у мыши обнаружил, что 70% ее приходится на фракцию гетерохроматина, хотя последняя составляет не более 10% всего хроматина ядра (Yasmin, Yunis, 1970). Аналогичные сведения о преимущественном содержании сателлитной ДНК в гетерохроматине были получены на других видах животных. Эти факты свидетельствуют, что гетерохроматин, прежде всего аутосомный, по крайней мере частично состоит из специфической достаточно однородной ДНК, то есть представляет собой в полном смысле слова структурный гетерохроматин.

Специфичность ДНК структурного гетерохроматина нашла дальнейшее подтверждение в экспериментах по гибридизации нуклеиновых кислот на цитологических препаратах. В первом таком исследовании, выполненном на хромосомах мыши, обнаружилось поразительное соответствие локализации сателлитной ДНК околоцентромерному структурному гетерохроматину (Pardue, Gall, 1971; рис. 46). В главе V дана подробная картина результатов подобных исследований применительно к геному человека. Важнейший элемент этой картины, которого мы частично тогда касались, но который теперь необходимо подчеркнуть, состоит в том, что во всех случаях достоверно зарегистрированного локального распределения ДНК с мно-



Рис. 46. Распределение меченой тритием РНК, комплементарной сателлитной ДНК мыши, в хромосомах мыши. Метка локализуется исключительно в околоцентромерных районах хромосом (Pardue, Gall, 1971).

гократно повторяющимися последовательностями районами ее локализации являются районы структурного гетерохроматина. Среди них мы находим околоцентромерный гетерохроматин всех хромосом, выявляющийся по С-окраске. Сделана даже попытка провести параллель между локализацией флуоресцирующего интерстициального гетерохроматина и фракций ДНК с повторяющимися последовательностями (Sanchez, Yunis, 1974). Список видов, у которых найдена специфическая ДНК именно в гетерохроматине, неуклонно растет, включая представителей и низших эукариотов, и высокоорганизованных видов. Особенно большая информация получена на хромосомах разных видов дрозофилы (Rae, 1972, и др.).

Было бы ошибочно считать, что ДНК структурного гетерохроматина это только ДНК с повторяющимися последовательностями (Comings, 1972). Более того, известны примеры, когда крупные районы гетерохроматина не являются преимущественными носителями ДНК с мно-

жественными копиями последовательностей. У китайского хомячка такая ДНК локализуется главным образом в околоцентромерном гетерохроматине аутосом и ее очень мало в структурном гетерохроматине половых хромосом, который составляет около 10% всего хроматина генома (Aggighi *с. а.*, 1974). Сателлитная ДНК теленка почти не содержится в гетерохроматине X- и Y-хромосом. Эти исключения предостерегают от того, чтобы ставить знак равенства между ДНК гетерохроматина и ДНК с многократными копиями последовательностей.

Вопрос может быть поставлен и по-другому: локализуется ли повторяющаяся ДНК только в гетерохроматине? Ответ на него затруднен, так как ни в биохимических, ни в цитологических исследованиях нет возможности полностью отдифференцировать фракции или районы эухроматина и гетерохроматина. Несомненно одно, что большое количество ДНК с повторяющимися последовательностями локализовано по длине плеч всех хромосом. Это имеет место в геноме человека (см. главу V), такое же положение наблюдается и у других изученных организмов. Похоже на то, что вне крупных блоков структурного гетерохроматина размещается ДНК с меньшим числом копий, «промежуточная» по скорости ренатурации. Весьма вероятно, что она входит в состав интерстициального структурного гетерохроматина.

Имеются твердо установленные факты относительно того, что эухроматин как таковой может состоять не только из уникальных копий ДНК. Ядрышковый организатор, включающий сотни рибосомных генов, гены транспортных РНК и гистонов, — все это примеры генетически активного хроматина, который содержит ДНК с промежуточной скоростью ренатурации, способную к транскрипции в естественных условиях жизни клетки. Не исключено существование и ряда других структурных генов в нескольких копиях. Накапливаются сведения о том, что уникальные и повторяющиеся последовательности являются тесно связанными элементами каждого транскриптона (Г. П. Георгиев, 1973; Bonner *с. а.*, 1974; Davidson *с. а.*, 1975, и др.).

Распределение классов ДНК по длине хромосом, их взаимосвязь с уже известными другими особенностями хромосомных районов — все это новая глава в изучении организации хромосом, которую можно охарактеризовать как молекулярно-цитологическую. Факты здесь накопи-

ваются быстро, и, очевидно, не заставят себя ждать обобщения их в ближайшее время.

Для суждения о повторяемости нуклеотидных последовательностей ДНК в разных типах хроматина в ряде работ используется акридиновый оранжевый. При этом исходят из результатов взаимодействия этого флуорохрома с ДНК в растворах, когда при его взаимодействии с двунитчатой ДНК свечение сдвигается в зеленую область спектра, однонитчатая (денатурированная) ДНК дает красное свечение. В экстраполяции на хромосому предполагается, что при проведении процедур денатурации—ренатурации ДНК *in situ*, на хромосомном препарате, двухцветное свечение будет отражать распределение в хромосомах ДНК с различной способностью к ренатурации, т. е. с различной обогащенностью копиями сходных последовательностей.

Действительно, в нескольких исследованиях обнаружено, что после щелочной или тепловой денатурации хромосомы приобретают красное свечение (de la Chapelle *et al.*, 1971, 1973; Bobrow, Madan, 1973; Comings, 1973; Comings *et al.*, 1973). Воздействие на препараты формалином, который препятствует ренатурации ДНК, стабилизирует красное свечение. Процедура ренатурации восстанавливает зеленое свечение прежде всего в районах структурного гетерохроматина.

Интерпретировать все эти данные с точки зрения состояния нативности ДНК, в свою очередь связанной с повторяемостью ее нуклеотидных последовательностей, следует с большой осторожностью. Имеются наблюдения, когда изменение цвета флуоресценции хромосомного участка, окрашенного акридиновым оранжевым, происходит при сохранении двунитчатой структуры ДНК. Так ведут себя хромосомы при окраске этим флуорохромом препаратов, предварительно обработанных трипсином в соответствии с методикой G-окраски (Bobrow, Madan, 1973). Ярко светят в красной области участки хромосом, включающие 5-бромдезоксиуридин или отстающие в конденсации под воздействием холода (В. А. Бенюш, Л. П. Тупицына, 1975; Dutrillaux *et al.*, 1972). Во всех этих случаях изменение спектра испускаемого излучения не связано с повторяемостью нуклеотидов в соответствующих участках хромосом. Эти данные ставят под сомнение возможность судить о химических особенностях ДНК в хромосомных участках по тесту с акридиновым оранжевым.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОКРАШИВАЕМОСТЬ — ОТРАЖЕНИЕ ЕДИНСТВА РАЗНЫХ СТОРОН ЛИНЕЙНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОСТИ ХРОМОСОМЫ

Две особенности, характеризующие явление дифференциальной окрашиваемости хромосом, а именно его универсальность для эукариотов и индивидуальность выражения в каждой хромосоме, уже сами по себе недвусмысленно указывают на то, что это явление отражает существенные черты организации хромосомы эукариотов, причем такие черты, которые определяют линейную неоднородность хромосомы. Естественно, что с самого начала и до настоящих дней не ослабевает интерес к изучению механизмов дифференциального окрашивания хромосом. Накопленные по этому вопросу сведения обширны и нередко противоречивы, они пока еще не позволяют нарисовать полную картину природы дифференциальной окрашиваемости. Однако они достаточны, чтобы утверждать, что это самый сложный феномен, в котором отражаются разные стороны химической, структурной и функциональной дифференцированности хромосомы. Специфичность же его проявления для кариотипа данного биологического вида и для каждой хромосомы данного кариотипа отражает специфичность линейной специализации хромосомы, которая не может не быть индивидуальной. Фактические данные и их трактовка по этой проблеме представляются следующими (А. Ф. Захаров, 1975; Comings, 1972, и др.).

Дифференциальная окрашиваемость и химическая структура красителя

Способность флуорохромов избирательно окрашивать участки хромосом при прочих равных условиях обнаруживает определенную связь с химической структурой их молекул (Caspersson e. a., 1969). Структура должна включать циклическое ядро и боковые цепи, этим требованиям отвечают такие флуорохромы, как акрихин, профлавин, препарат Хехст 33258 и др. (см. с. 131). Для дифференциальной окраски флуорохромами этого типа не требуется предварительных обработок препаратов. Акридиновый оранжевый избирательно окрашивает хромосому только после определенных температурно-солевых или ферментных воздействий (Bobrow, Madan, 1973). Представления о механизме взаимодействия флуорохромов с

хромосомой вытекают из хорошо изученных их взаимодействий с ДНК в растворах (Weisblum, Haseh, 1972; Selander, de la Chapelle, 1973; Weisblum, 1974). Важный элемент этого взаимодействия состоит в интеркаляции молекул красителя между нуклеотидными парами или в малую бороздку молекулы ДНК. По мнению Sumner с сотр. (1973), помимо интеркаляции, длинная боковая цепь молекулы акрихина двумя положительными зарядами взаимодействует с фосфатными группами ДНК, а также может образовать с нею ионные связи. Эти авторы предполагают, что в зависимости от конфигурации молекул ДНК и расстояния между ближайшими фосфатными группами в разных участках хромосомы создаются разные условия для связи с красителем и флуоресценции. В условиях действия на хромосомы вероятно реакция флуорохрома также с белками, хотя этот вопрос остается неизученным.

Обязательными компонентами нефлуоресцирующих красителей являются метиленовый синий, азуры и эозин, но серии коммерческих красителей ряда Романовского весьма гетерогенны по набору и количественному составу этих и других красящих компонентов. Имеется несколько работ по вопросу о том, какие компоненты этих красителей вызывают дифференциальное окрашивание. По данным Sumner и Evans (1973), компоненты красителя Гимзы и родственных ему вызывали четкую дифференциальную окраску только в комбинации с эозином. Это производные тиазина, являющиеся трициклическими соединениями (см. с. 131). Краситель Гимзы может быть успешно заменен смесью метиленового синего и эозина в соотношении 1:1. Изучение в эксперименте взаимодействия этой смеси с препаратами ДНК и фиксированными хромосомами позволило авторам прийти к следующему заключению. Компоненты красителя Гимзы связываются почти исключительно с ДНК хромосомы. Связывание разворачивается ступенчато: сначала с ДНК реагирует молекула метиленового синего, затем эозина с последующим взаимодействием этих молекул между собой и формированием красящего комплекса. По молекулярной конфигурации последний представляет собой два циклических ядра, фиксированных на ДНК посредством интеркаляции и через ионные связи, а между собой через циклическую молекулу эозина. Условия для формирования этого комплекса, то есть для окрашивания, разные в разных участ-

ках хромосомы в зависимости от конфигурации и плотности упаковки нитей ДНП. Тиазин-эозинат рассматривается в качестве красящего хромосомы компонента и другими исследователями (Vogel e. a., 1974). Имеются данные, по которым с ДНК хромосом реагируют все тиазиновые компоненты красителя Гимзы, имеющие в химической структуре метильные группы (метиленовый синий и азурь), эозин же для дифференциального окрашивания хромосомы не является необходимым (Comings, 1975; Comings, Avelino, 1975). В концентрациях, используемых для окраски хромосом, эти красители взаимодействуют с ДНК не столько путем интеркаляции, сколько посредством бокового связывания (Comings, Avelino, 1975). Высказывается мнение, что компонентом основных красителей ряда Романовского — Гимзы, красящим хромосому избирательно, является метиленовый фиолетовый, который образуется в процессе растворения сухих компонентов в метиловом спирте при приготовлении красителей (Curtis, Nogobin, 1975).

Итак, данные по химической структуре молекул красителя и их взаимодействию с макромолекулами, строящими хромосому, позволяют считать, что: а) в хромосомную окраску бесспорно вовлекается ДНК и предположительно белки; б) взаимодействие красителя с этими молекулами и зависящая от него степень окрашивания определяются при прочих равных условиях конфигурацией и взаиморасположением молекул ДНП в хромосоме.

Дифференциальная окрашиваемость и химический состав хромосомы

Сравнительное участие разных макромолекул, входящих в состав хромосомы, в возникновении избирательного окрашивания подверглось исследованию в различных экспериментах. Полученные результаты позволяют считать, что окраска хромосом связана с двумя типами макромолекул: ДНК и белками. РНК не рассматриваются в качестве окрашивающегося субстрата, поскольку их удаление из хромосомы не влияет на характер окраски (Aggighi, Hsu, 1971; Comings e. a., 1973; Sumner, Evans, 1973).

Участие ДНК. О том, что ДНК является обязательным участником окрашивания, свидетельствует невозможность получения неравномерного окрашивания после удаления из хромосом ДНК (Comings e. a., 1973; Sumner,

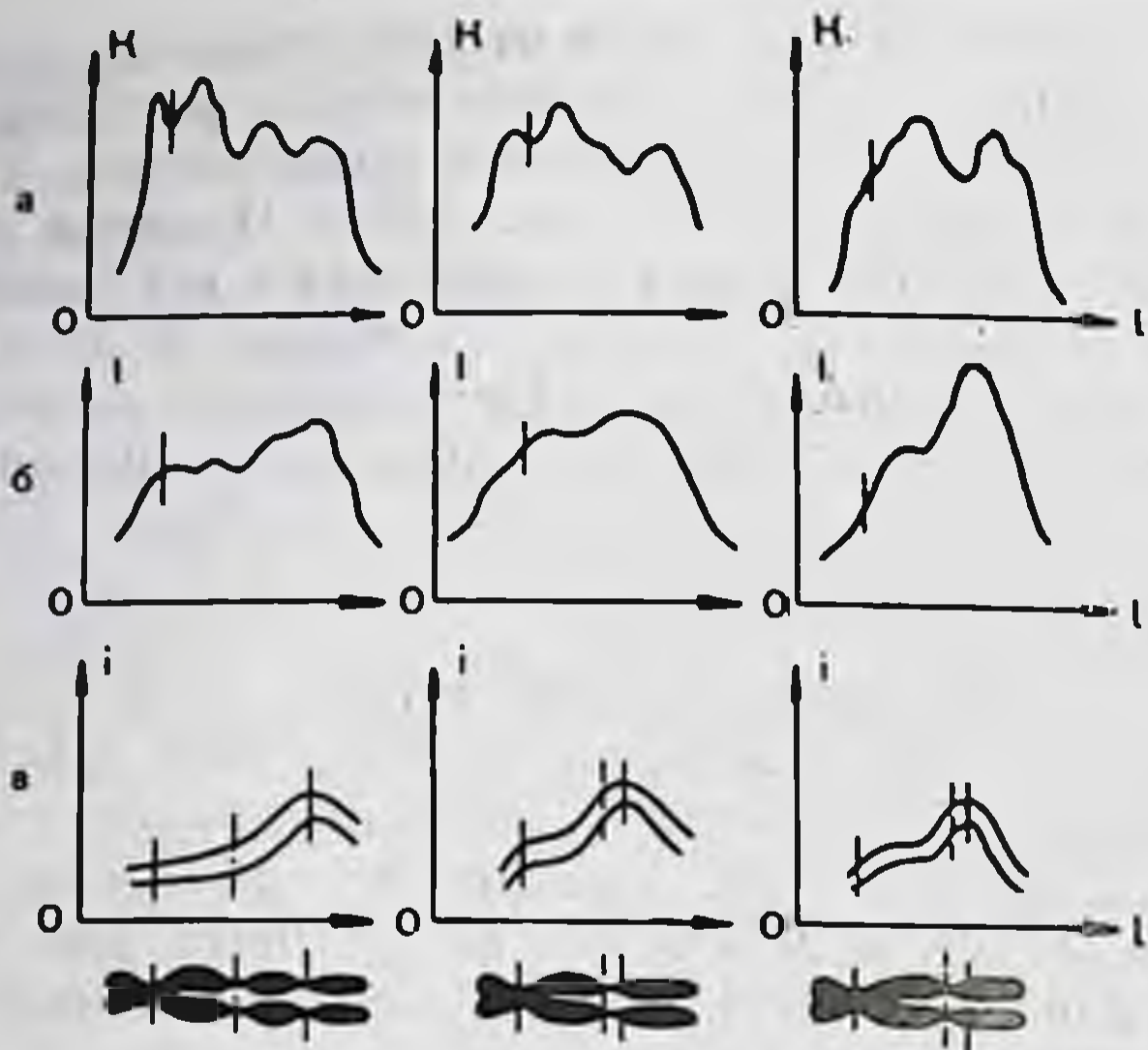


Рис. 47. Распределение содержания ДНК (а), яркости флуоресценции (б) и удельной интенсивности флуоресценции (в) вдоль трех Y-хромосом человека, дифференциально конденсированных под влиянием 5-бромдезоксинуридина.

По оси абсцисс — длина хромосомы (в отн. ед.), по оси ординат: а — содержание ДНК (в отн. ед.), б — яркость флуоресценции (в отн. ед.), в — удельная интенсивность флуоресценции. Вертикальными штрихами отмечено положение центромеры (В. А. Бенюш и др., 1975).

Evans, 1973; Vogel e. a., 1974). Факт этот очевиден, и неравномерность окрашивания хромосомы могла бы зависеть от того, что в разных ее участках имеется: а) разное количество ДНК; б) неодинаковое физическое ее состояние; в) качественная гетерогенность.

Количественное распределение ДНК вдоль М-хромосомы у *Vicia faba*, определенное цитофотометрически, никак не коррелировало с присутствием ярко флуоресцирующих сегментов после окраски акрихином или акрихинипритом (Caspergsson e. a., 1969). Аналогичные данные получены на хромосомах дрозофилы и на Y-хромосоме человека (рис. 47). Нет корреляции между сравнительно равномерным количественным распределением ДНК по длине хромосом мыши и избирательностью окраски их районов по G-технике (Comings e. a., 1973). В ряде работ тщательный денситометрический анализ хромосом, особенно после обработки по технике G-окраски, показывает определенную неравномерность количественного содержания ДНК по длине хромосомы, совпадающую с рисун-

ком G-окрашивания (McKay, 1973; Meisner e. a., 1973; Yunis, Sanchez, 1973; Rodman, 1974). Однако такая неравномерность значительно меньше различий в интенсивности окрашивания. При C-окрашивании наблюдается особенно большая разница между весьма интенсивной окрашенной околоцентромерного хроматина и ахроматичностью остальной части хромосомы. Предварительная обработка хромосом по C-технике удаляет значительное (до 60%) количество ДНК из неокрашивающихся районов хромосом (Comings, 1973; Comings e. a., 1973; Schnedl, 1973). Но один этот факт не объясняет феномена окрашиваемости по C-технике, поскольку диапазон различий в содержании ДНК значительно меньше, чем в количестве красителя. Кроме того, хорошо известно, что C-сегменты могут появляться на препаратах при щадящей обработке (трипсином, например), когда значительного удаления ДНК из хромосомы не происходит (Dutrillaux, Covic, 1974). Таким образом, неравномерностью количественного распределения ДНК вдоль хромосомы невозможно объяснить возникновение избирательности окрашивания.

Окрашивание центромерного гетерохроматина впервые удалось наблюдать на хромосомных препаратах, предварительно прошедших через процедуры «денатурации» и «ренатурации» ДНК с целью их подготовки для опытов гибридизации *in situ* (Pardue, Gall, 1970). Естественно, что причину неравномерного окрашивания стали видеть в неодинаковой степени нативности ДНК в разных участках хромосомы, а воздействие щелочами и инкубацию в стандартном солевом растворе рассматривали как обеспечивающие избирательную ренатурацию ДНК в окрашивающихся по Гимзе гетерохроматиновых районах (Argighi, Hsu, 1971, и др.). Последующие наблюдения показали, что нативность ДНК не имеет значения для дифференциального окрашивания хромосомы: 1. ДНК хромосом, фиксированных в метанол-уксусном фиксаторе и распластанных на стекле без подогревания, заметно не меняет своей нативности. Это следует из сохранения такими хромосомами свечения в зеленой области спектра после связывания акридинового оранжевого. Кривые температуры плавления ДНК, выделенной из лейкоцитов, фиксированных в метанол-уксусном фиксаторе и из нефиксированных, существенно не различаются (Sumner e. a., 1973). По данным ультрацентрифугирования в градиенте плотности Cs_2SO_4 и воздействия нуклеазами, ДНК фиксиро-



Рис. 48. Дифференциальное свечение хромосом у мыши (*Mus poschiavicus*) при окраске флуорохромом Хехст 33258. Активная флуоресценция околоцентромерных районов, содержащих обогащенную А—Т сателлитную ДНК (оригинал от А. Горр).

ванных таким способом клеток остается на 80% двунитчатой (Kugnit, 1974). 2. Наибольшее количество постфиксационных воздействий, применяемых в технике С-окраски (см. с. 136 главы VI), не изменяет нативности ДНК ни в целом, ни в отдельных районах хромосом. 3. Денатурация ДНК в хромосоме не является условием дифференциальной окраски. Щелочная обработка препаратов при С-окраске денатурирует ДНК, причем в определенных условиях можно добиться избирательной денатурации ДНК только околоцентромерных районов, или, наоборот, остальной части хромосомы, как это следует по тесту с акридиновым оранжевым (de la Chapelle e. a., 1973; Comings, 1973; Comings e. a., 1973).

Независимо от этого при С-окраске краситель воспринимается только околоцентромерным хроматином.

Зависимость возникновения дифференциального окрашивания от типа ДНК — наиболее интересный факт, по-

лученный в ряде работ. Соответствующие наблюдения многочисленны, но трудны для интерпретации, поскольку малоизученной остается первая часть вопроса: характеристика линейной гетерогенности хромосомы по составу ДНК (см. главу V). Поиски ответа на поставленный вопрос проводятся путем сопоставления локализации по-разному окрашивающихся участков хромосомы с характеристикой ДНК этих участков.

Многочисленные модельные эксперименты по изучению интенсивности свечения флуорохромов при их взаимодействии с ДНК известного нуклеотидного состава показывают, что отношение А—Т : Г—Ц — это один из существенных факторов, влияющих на люминесценцию акрихина: обогащенность ДНК парами А—Т ее усиливает, избыток пар Г—Ц гасит (см. с. 99 главы V, рис. 48). Близкие данные получены для двух других флуорохромов, которые рассматриваются авторами как особенно специфично реагирующие с участками хромосом, содержащими избыток пар А—Т (Disteche, Bonlemps, 1974; Weisblum, Hagensler, 1974). В соответствии с этими материалами находятся цитологические наблюдения, согласно которым активно флуоресцирующие районы хромосом совпадают с локализацией обогащенной А—Т сателлитной ДНК, а нефлуоресцирующие — с локализацией богатой Г—Ц ДНК. Первый случай может быть иллюстрирован яркой флуоресценцией районов локализации сателлитной ДНК I в хромосомах человека (Jones e. a., 1974).

Представление о разном составе оснований ДНК привлекается для объяснения R-окрашиваемости хромосом. Вариант этой окраски с акридиновым оранжевым, когда одни участки хромосом флуоресцируют в зеленой, а другие — в красной области спектра, объясняется более легкой денатурацией районов красной флуоресценции из-за предполагаемого большого содержания А—Т-нуклеотидов (de la Chapelle e. a., 1973; Bobrow, Madan, 1973). Это — участки, которые являются Q- и G-положительными.

Однако имеется много наблюдений, которые находятся в противоречии с приведенными фактами и не позволяют рассматривать нуклеотидный состав ДНК как главный, а тем более единственный фактор в механизмах дифференциальной окрашиваемости. Часть этих наблюдений, полученная при изучении взаимодействия флуорохромов с ДНК в растворах, приведена ранее (см. с. 99 главы V). Добавим здесь, что имеются хромосомы, для которых по-

казана пониженная флуоресценция участков, содержащих сателлитную обогащенную А—Т ДНК при окраске акрихином. У человека это околоцентромерные гетерохроматиновые районы хромосом 1, 9 и 16. Уместно также отметить, что нефлуоресцирующие районы хромосом человека 1, 9 и 16, содержащие сателлитные ДНК II и III, которые имеют избыток пар А—Т над парами Г—Ц, после предварительной обработки по технике G-окраски начинают ярко светиться (Ganper, Evans, 1971; de la Chapelle e. a., 1971, 1973). Это говорит об участии дополнительных факторов в окрашивании.

Выше мы уже говорили о многих указаниях на родственные отношения, существующие между С-сегментами и G-сегментами (см. с. 144 главы VI). В частности, С-сегменты чаще всего возникают на месте G-сегментов, возникновение тех и других обусловлено одними и теми же факторами предварительной обработки препаратов, различающимися лишь интенсивностью воздействия. Все эти моменты позволяют предполагать, что G-сегменты также обогащены ДНК с последовательностями, повторяющимися неоднократно, но не столь много раз, как это имеет место в сателлитных ДНК (Comings, 1972). Поэтому можно думать, что особенности хромосомной ДНК влияют на избирательность окрашиваемости, и это влияние зависит, скорее всего, от состава азотистых оснований.

Участие белков. Первые факты в пользу участия белков в окрашивании связаны с природой факторов постфиксационной обработки препаратов, которые создают условия для избирательного окрашивания при использовании нефлуоресцирующих красителей. Суммировать эти наблюдения можно следующим образом (см. также главу VI, с. 136). 1. Окрашивание возникает после обработки препаратов протеазами типа трипсина, проназы и др. 2. Для возникновения окрашивания достаточна обработка препаратов веществами, растворяющими белки, денатурирующими их, влияющими на их химические связи (мочевина, 2-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия и др.). Одно из возможных объяснений действия этих веществ состоит в том, что они избирательно удаляют белки из участков хромосомы. Действительно, элиминация белков происходит, но ее величина невелика. Например, при воздействии на препараты 0,005% раствором трипсина удаляется менее 8% белка фиксированных хромосом (Comings e. a., 1973). Важно отметить, что условия для диф:

ференциальности окраски создаются при инкубации препаратов в солевых растворах, не содержащих ионов кальция и магния. Уместно напомнить здесь, что в определенных условиях можно наблюдать обратимость G- и R-окрашивания (Dutrillaux, Covic, 1974).

Все эти факты заставляют считать, что в основе дифференциального окрашивания лежит не избирательная элиминация белков, а изменение связей белок — белок и белок — ДНК в структуре хромосомы.

Какие хромосомные белки участвуют в окраске и почему их взаимодействие между собой и ДНК может быть различно в разных районах хромосомы?

В главе V говорилось, что фактические данные о количественном распределении белков в разных районах хромосом и об их качественном составе чрезвычайно скудны. Из этих данных можно сделать лишь один вывод, а именно, что районы хромосом, резко различающиеся между собой по комплексу характеристик, могут, по-видимому, различаться по характеру входящих в их состав белков.

С точки зрения возможной разницы во взаимосвязях белков в разных участках хромосомы интерес представляют немногочисленные пока сведения о дисульфидных связях. Биохимически показана обогащенность дисульфидными связями метафазного хроматина по сравнению с интерфазным (Sadgoral, Bonper, 1970). Имеются наблюдения в пользу неодинакового их количества или неодинаковой реактивности в эухроматиновых и гетерохроматиновых районах. Под влиянием 2-меркаптоэтанола, введенного в культуру клеток в G₂-периоде, затрудняется формирование эухроматиновых районов, что выражается в ослаблении их окраски на фиксированных хромосомах (Л. В. Потоки, 1975). Обработка этим агентом фиксированных хромосом приводит к утрате окраски в тех же районах, если он применяется в малых дозах, и по длине всей хромосомы, если используются большие дозы и длительное время воздействия (Л. В. Потоки, 1975; Sumper, 1974). Условия для избирательного окрашивания создаются и другими способами окисления —SS— или SH-связей. Этим наблюдениям можно дать двойное объяснение. Можно предположить, как это делает Sumper (1974), что районы гетерохроматина особенно богаты дисульфидными связями и поэтому повышено устойчивы к действию 2-меркаптоэтанола, восстанавливающего их в SH-группы. Кажется более реальным противоположное объяснение:

—SS— связями особенно обогащен эухроматин, что и делает его чувствительным к действию 2-меркаптоэтанола. Конденсация хромосомного материала в гетерохроматине должна происходить в таком случае с помощью пока неизвестных механизмов.

Говоря об участии белкового компонента хромосомы в ее неравномерном окрашивании, нельзя упускать из вида влияния процедуры фиксации на состояние хромосомных белков. Фиксация, используемая при приготовлении хромосомных препаратов, обязательно включает воздействие уксусной кислоты. Как показывают цитохимические тесты, при этом из хромосомы удаляются все основные белки. Дополнительная экстракция гистоновых белков не влияет на качество окрашивания (Sumner *et al.*, 1973; Comings, Avelino, 1974). При этом полное удаление гистонов из хроматина подтверждено электрофоретическим анализом (Comings, Avelino, 1974). Эти данные свидетельствуют о том, что в возникновении избирательного окрашивания основные белки не участвуют (Vogel *et al.*, 1974).

Участие кислых белков в избирательном окрашивании хромосом не оспаривается (Comings *et al.*, 1973; Sumner *et al.*, 1973; Vogel *et al.*, 1974). Исходят, во-первых, из того, что в фиксированной хромосоме остается много именно кислых (остаточных) белков. Показано, что $1/4$ — $1/3$ сухого вещества фиксированного хроматина приходится на не окрашивающийся в реакции Фельгена материал. Однако пока почти ничего неизвестно о том, что это за белки, каково их распределение в хромосоме. По-видимому, такое распределение равномерно по длине хромосом (Comings *et al.*, 1973; Sumner *et al.*, 1973). На основании неравномерного связывания по длине хромосомы уранина — красителя, реагирующего с кислыми белками, Vogel *et al.* (1974) считают, что хромосомные участки могут различаться по качественному составу белков, что в свою очередь зависит от нуклеотидного состава ДНК хромосомного района. Высказано обоснованное предположение, что неравномерность окрашивания красителем Гимзы обусловлена тем, что в ходе предварительной обработки препаратов вдоль хромосомы происходит дифференциальная денатурация кислых белков. Денатурированные белки предотвращают реакцию ДНК с тиазиновыми красителями (Comings, Avelino, 1975).

Из представленных материалов следует, что в дифференциальном окрашивании хромосомы основополагаю-

шую роль играют ДНК и белки, что их макромолекулы осуществляют свою роль в тесном взаимодействии, что по этим свойствам разные районы хромосом отличаются один от другого. Такой вывод заставляет обратиться к особенностям хромосомы как целостной надмолекулярной системы в разных ее районах.

Дифференциальная окрашиваемость и структурно-функциональная подразделенность хромосомы

Подразделенность хромосомы на эухроматиновые и гетерохроматиновые районы и способность к избирательному окрашиванию оказались взаимосвязанными характеристиками хромосом. По С-технике краситель Гимзы окрашивает исключительно структурный гетерохроматин, чаще всего локализованный в окружности центромеры.

В предыдущей главе на примере хромосом человека была показана взаимосвязь С- и G-сегментов. Эти данные поставили вопрос о том, что G-сегменты могут быть разновидностью структурного гетерохроматина. Эти сегменты отвечают ряду характеристик гетерохроматина. Они соответствуют районам поздней редупликации, как это следовало, хотя и не всегда убедительно, из сопоставления включения метки и топографии этих сегментов (А. Ф. Захаров и др., 1973; Ganner, Evans, 1971; Schnedl, 1973). Сомнения исчезают, если обратиться к сравнению рисунка G-окрашивания с рисунком хронологии репродукции, определяемой с помощью 5-бромдезоксимуридина (см. с. 89 главы IV, а также Zakharov, Egorina, 1976).

Совокупность этих данных позволяет отнести G-сегменты к гетерохроматиновым районам и присоединиться к представлению о том, что они отражают локализацию интерстициального гетерохроматина (Comings et al., 1973; Comings, 1973). По-видимому, эти два вида гетерохроматина различаются между собой как особенностями ДНК (степень повторяемости нуклеотидных последовательностей), так и временем репродукции в S-периоде.

Принципиальное соответствие топографии по-разному окрашивающихся районов хромосом их структурно-функциональной подразделенности указывает на два существенных момента. Во-первых, дифференциальная окрашиваемость метафазных хромосом, очевидно, определяется комплексом тех химических, физических и

структурных факторов, которые обеспечивают возникновение хроматина в разных его видах. В этот комплекс должны входить не только первичная молекулярная организация хромосомы, но и те элементы, которые определяют образование хромосомы как цитологической структуры. Во-вторых, поскольку этот тинкториальный феномен имеет место в метафазной хромосоме, мы вправе сделать вывод, что в метафазной хромосоме сохраняются те особенности организации, которые полностью развернуты в интерфазном ядре и обеспечивают дифференциальное функционирование генома.

В настоящее время накопился определенный фактический материал в пользу представления, что в метафазной хромосоме гетерохроматин и эухроматин действительно различаются по особенностям упаковки ДНП, по плотности конденсации (Вагг, Ларсен, 1974) и что это различие весьма существенно для возникновения дифференциального окрашивания участков хромосомы.

По электронномикроскопическим данным, обработка трипсином, щелочью и др., необходимая для получения С-окраски, значительно разрыхляет неокрашивающиеся районы и слабо влияет на плотность хроматина в С-районах, как это видно из рис. 49 (Comings e. a., 1973). Сходные данные получены при изучении хромосом под световым микроскопом с помощью фазово-контрастного устройства и в ультрафиолетовом свете (McKay, 1973; Yunis, Sanchez, 1973). Реакция на предварительную обработку и окраску со стороны хромосомы как целостной цитологической структуры, с соответствующей дифференцированностью ее по длине, показана при изучении трехмерной структуры фиксированной хромосомы (В. А. Бенюш, А. И. Ибраимов, 1973; Gormley, Ross, 1972, 1976).

Из имеющихся данных можно заключить, что физико-химические и химические взаимодействия макромолекул хромосомы с молекулами красителей осуществляются в цитологической структуре в самой тесной связи с ее архитектурой и что последняя различна в разных районах хромосомы в соответствии с их специализацией по структуре и функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из изложенного в этой главе материала следует, что разные структурные и функциональные характеристики, на основе изучения которых познается организация

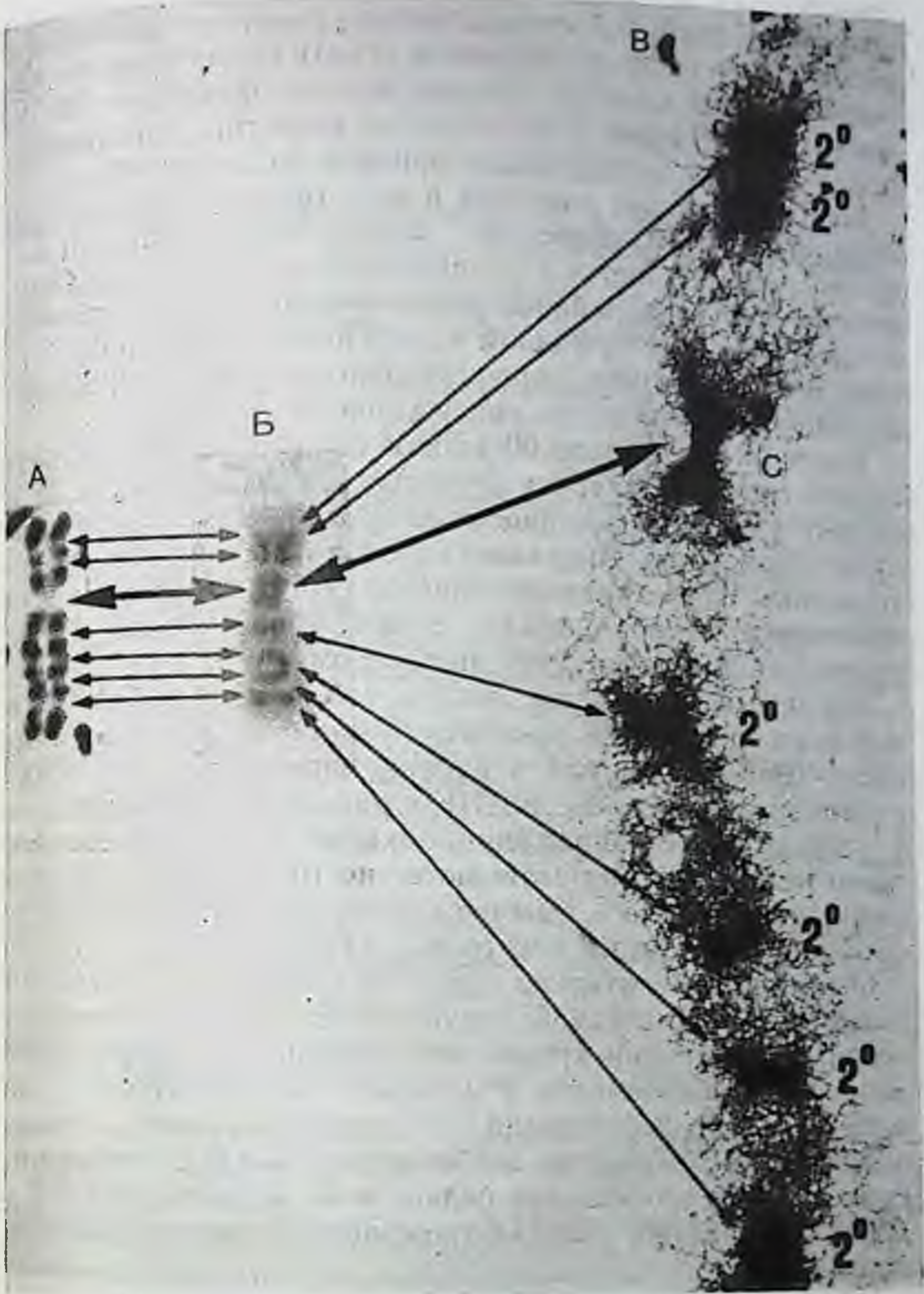


Рис. 49. Районы вторичных перетяжек маркерной хромосомы мыши под световым микроскопом при обычной окраске (А) соответствуют плотно окрашенным по С-технике (Б). Эти районы наиболее устойчивы к разрыхляющему хроматин действию 0,005% раствора трипсина, как показывает электронная микроскопия (В). Толстая стрелка обозначает район центромеры (С) (Comings e. a., 1973).

хромосомы в целом, являются разными сторонами одного явления — глубокой специализации участков хромосомы эукариотов в ее предназначении играть сложную роль интегрированной системы наследственных факторов. Взаимосвязь этих сторон выяснилась по мере того, как расширялся арсенал методических приемов их изучения.

Наиболее ранние сведения в этой области относятся к обнаружению взаимосвязи между подразделенностью хромосомы на участки с разным количеством менделирующих генов и на районы, различающиеся по состоянию конденсации в интерфазном ядре. Понятия «гетерохроматин» и «эухроматин», первоначально цитологические, наполнились генетическим содержанием.

Конец 50-х — начало 60-х годов ознаменовались разработкой методов изучения репродукции ДНК хромосом и открытием разновременности редупликации разных участков хромосомы. Выяснилось, что новая черта в характеристике структурно-функциональной неоднородности хромосомы тесно связана с уже известными: время репродукции определяется типом хроматина.

Переход к 70-м годам явился еще одним рубежом в изучении организации хромосом: была открыта гетерогенность ДНК эукариотов и неравномерное распределение различающихся семейств ДНК в разных хромосомах и их участках. Новое направление показывает, что гетерохроматин и эухроматин различаются не только структурно и функционально, но в конечном итоге и химическими особенностями входящей в их состав ДНК.

Особенно убедительно свидетельствует о глубокой взаимосвязи химической, структурной и функциональной сторон организации хромосомы явление ее дифференциальной окрашиваемости в метафазе, обнаруженное уже в начале этого десятилетия. Механизмы этого явления включают и химические особенности входящей в хромосому ДНК, и особенности белков и их взаимодействий с ДНК, и специфику укладки хромонемы в разных районах хромосомы.

Обозревая пройденный путь, можно видеть, что развитие нашего познания хромосомы вплотную подошло к такому этапу, когда становится особенно настоящим синтез фактов и представлений о хромосоме, накопленных в предыдущие годы и активно пополняющихся сегодня.

ЛИТЕРАТУРА

- Агаева Д. М., Прокофьева-Бельговская А. А. Особенности редупликации хромосомы 1 у человека в конце периода S. — «Цитология», 1974, т. 16, № 2, с. 172—177.
- Барановская Л. И. Линейная дифференциация X-хромосомы человека в норме и при изменениях в системе X-хромосом. Дис. канд. М., 1973.
- Барановская Л. И., Бенюш В. А. Дифференциация по длине хромосом человека и проблема их идентификации. II. X-хромосома. — «Цитология», 1973, т. 15, № 6, с. 650—658.
- (Барановская Л. И., Захаров А. Ф.) Baranovskaya L. I., Zakharov A. F. H^3 -deoxycytidine incorporation into X-chromosomes differentially condensed under 5-bromodeoxyuridine treatment in cases of 49, XXXXV, 48 XXXX, 47, XXX, 46, X, i/Xq, and 45, X/46, X, i/Xq/ — «Humangenetik», 1974, Bd 23, S. 131—136.
- Бенюш В. А. О дифференциальной окраске хромосом человека акрихином. — «Бюлл. exper. биол.», 1973, т. 76, № 9, с. 122—125.
- Бенюш В. А., Барановская Л. И., Мирзаянц Г. Г. Изучение функционального состояния плеч в изо-X-хромосоме человека. — «Генетика», 1975, т. 11, № 12, с. 102—109.
- Бенюш В. А., Ибраимов А. И. Изменение рельефа хромосом при некоторых цитологических обработках. — «Бюлл. exper. биол.», 1974, т. 77, № 1, с. 80—83.
- Бенюш В. А., Тупицына Л. П. Двухцветная флуоресценция дифференциально конденсированных хромосом, окрашенных акридином оранжевым. — «Бюлл. exper. биол.», 1975, т. 79, № 4, с. 108—110.
- Бенюш В. А., Облапенко Н. Г., Захаров А. Ф. Линейная дифференцированность Y-хромосомы человека. — «Цитология», 1975, т. 17, № 1, с. 19—23.
- № 1, с. 141—147.
- Борджадзе В. К., Прокофьева-Бельговская А. А. Пахитенный анализ акроцентрических хромосом человека. — «Генетика», 1971, т. 7, № 1, с. 141—147.
- Буланов А. Г., Гринберг К. Н. Сцепление генов и карты хромосом человека. — В кн.: Генетика человека. Т. I. «Итоги науки и техники». ВИНТИ, М., 1973, с. 11—44.
- Варшавский А. Я. Структурная организация хроматина. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 81, № 2, с. 209—224.
- Георгиев Г. П. О структуре единиц транскрипции в клетках эукариотов. — «Успехи биол. химии», 1973, т. 14, с. 3—46.
- Гиндилис В. М. Принципы идентификации хромосом человека. Дис. канд. М., 1967.
- Дифференциальная спирализация вдоль митотических хромосом млекопитающих. II. Дифференциация в хромосомах человека, обнаруживаемая с помощью 5-бромдезоксимуридина и 5-бромдезоксидитидина. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5-bromodeoxyuridine and 5-bromodeoxycytidine-revealed differentiation in human chromosomes. — «Chromosoma», 1974,

- Vd 44, S. 343—359. Aut.: A. F. Zakharov, L. I. Baranovskaya, A. I. Ibraimov, V. A. Benjush, V. S. Demintseva, N. G. Oblarenko. Дифференциальная спирализация и хромосомный анализ. — «Цитология», 1974, т. 16, № 3, с. 287—298. Авт.: А. Б. Иорданский, А. Р. Круминь, С. А. Павулсоне, Н. С. Бадаев, Г. В. Дерягин.
- Дифференциация хромосом человека по длине и проблема их идентификации. I. Общая картина дифференциации, выявляемая с помощью 5-бромдезоксинуридина. — «Цитология», 1973, т. 15, № 5, с. 508—518. Авт.: А. Ф. Захаров, Л. И. Барановская, В. С. Деминцева, А. И. Ибраимов.
- Еголина Н. А., Захаров А. Ф. Репликационная структура хромосом человека в опытах с 5-бромдезоксинуридином. — «Бюлл. экспер. биол.», 1976, т. 81, № 1, с. 76—78.
- Епифанова О. И., Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография. М., «Высшая школа», 1977.
- Захаров А. Ф. Гетерохроматин и генетическая инактивация в клетках млекопитающих. — «Успехи совр. биол.», 1968, т. 65, № 1, с. 83—106.
- Захаров А. Ф. Линейная дифференциация хромосом млекопитающих и человека. — «Вестн. АМН СССР», 1973, т. 12, № 1, с. 44—49.
- Захаров А. Ф. Новые методы изучения хромосом человека. — В кн.: Генетика человека. Т. 1. «Итоги науки и техники». ВИНТИ. М., 1973, с. 45—89.
- Захаров А. Ф. Дифференциальная окрашиваемость хромосом: феномен и механизмы. — «Успехи совр. биол.», 1975, т. 80, № 3 (6), с. 335—350.
- (Захаров А. Ф., Еголина Н. А.) Zakharov A. F., Egolina N. A. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. — «Chromosoma», 1972, Bd 38, S. 341—365.
- (Захаров А. Ф., Еголина Н. А.) Zakharov A. R., Egolina N. A. Correlation between patterns of DNA replication and chromosome banding. — «Biol. Zbl.», 1976, Bd 95, S. 319—326.
- Захаров А. Ф., Леликова Г. П. Локальное изменение спирализации хромосом в клетках опухолей яичка человека. — «Цитология», 1972, т. 14, № 9, с. 1092—1097.
- Ибраимов А. И. Линейная дифференцированность хромосом человека группы С. Дис. канд. М., 1974.
- (Изохромосома X у человека: различие длинных плеч по репликации ДНК). Isochromosome X in man: different DNA replication patterns in the long arms. — «Hum. Genet.», 1976, v. 32, p. 55 — Aut.: L. I. Baranovskaya, N. A. Egolina, A. F. Zakharov, T. G. Tsvetkova.
- Кикнадзе И. И. Функциональная организация хромосом. Л., «Наука», 1972.
- Кулешов Н. П., Алехин В. И. Хромосомные и геномные мутации у новорожденных детей. — «Генетика», 1974, т. 10, № 1, с. 143—151.
- Кулиев А. М. Фенотипические аспекты хромосомных эмбриолеталей (цитологическое и биохимическое исследование). Дис. докт. М., 1975.
- (Лурье И. В., Лазюк Г. И.) Lurie I. W., Lazjuk G. I. Partial monosomies 18. Review of cytogenetical and phenotypical variants. — «Humangenetik», 1972, Bd 15, S. 203.
- (Микельсаар А.-В. Н., Тьюор С. Я., Кяосаар М. Е.) Mikelsaar A.-V.-N., Tüür S. J., Käosaar M. E. Human karyotype polymorphism. I. Routine and fluorescent microscopic investigation of chromosomes in a normal adult population. — «Humangenetik», 1973, Bd 20, S. 89—101.

- Мирзаянц Г. Г. Нарушения в системе половых хромосом. — В кн.: Лекции по медицинской генетике. М., «Медицина», 1974, с. 336—359.
- (Популяционные цитогенетические исследования новорожденных в Москве) Population cytogenetic investigations of newborns in Moscow. — "Humangenetik", 1974, Bd 22, S. 139—152. Aut.: N. P. Vochkov, N. P. Kuleschov, A. N. Chebotarev, V. I. Alekhin, S. A. Midian.
- Потоки Л. В. Исследование реакции гетерохроматина и эухроматина на полнамиды. Дис. канд. М., 1975.
- Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматинизация как изменение цикла хромосомы. — «Журн. общей биол.», 1945, т. 6, № 2, с. 93—124.
- Прокофьева-Бельговская А. А. Цикл ядра и дифференциация соматических клеток. — В кн.: Вопросы цитологии и общей физиологии. М. — Л., 1960, с. 215—253.
- Прокофьева-Бельговская А. А. Репродукция хромосом. — В кн.: Основы цитогенетики человека. М., «Медицина», 1969, с. 104—144.
- Прокофьева-Бельговская А. А. Мейоз. — В кн.: Основы цитогенетики человека. М., «Медицина», 1969, с. 144—165.
- Прокофьева-Бельговская А. А. Хромосомы человека. — В кн.: Лекции по медицинской генетике. М., «Медицина», 1974, с. 22—54.
- Прокофьева-Бельговская А. А., Слезингер С. И. Репродукция хромосом в первичной культуре эмбриональных фибробластов человека. — «Генетика», 1967, т. 11, № 1, с. 56—70.
- (Прокофьева-Бельговская А. А., Слезингер С. И.) Prokofieva-Belgouskaya A. A., Slezinger S. I. Replication of human chromosomes in primary cultures of embryonic fibroblasts. II. Intrachromosomal asynchrony of DNA replication. — "Cytogenetics", 1968, v. 7, p. 347—360.
- Слезингер С. И., Лозовская Е. Р., Прокофьева-Бельговская А. А. Распределение АТ- и ГЦ-пар оснований ДНК по длине хромосом 1 и 2 в двух типах клеток человека. — «Докл. АН СССР», 1974, т. 217, № 2, с. 462—464.
- (Слезингер С. И., Прокофьева-Бельговская А. А.) Slezinger S. I., Prokofieva-Belgouskaya A. A. Replication of human chromosomes in primary cultures of embryonic fibroblasts. I. Interchromosomal asynchrony of DNA replication. — "Cytogenetics", 1968, v. 7, p. 337—346.
- Флейшман Е. В. Закономерности изменений кариотипа при некоторых гемобластозах. Дис. докт. М., 1975.
- Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. Ультраструктура клеточного ядра. М., «Наука», 1974.
- Are 1qh⁺ chromosomes harmless? — "Clin. Genet.", 1974, v. 6, p. 383—393. Aut.: R. J. M. Gardner, H. R. McCreanor, M. I. Parslow, A. M. O. Veale.
- Arrighi F. E., Hsu T. C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. — "Cytogenetics", 1971, v. 10, p. 81—86.
- Atkin N. B., Baker M. C. Chromocentres in polymorphs as interphase markers for chromosomes having increased constitutive heterochromatin. — "J. Med. Genet.", 1974, v. 11, p. 371—373.
- Back F. Euchromatic and heterochromatic behaviour of the human X2 chromosome in cell cycle development. — "Humangenetik", 1974, Bd 25, S. 315—329.

- Bahr G. F., Larsen P. M.* Structural "bands" in human chromosomes. *Adv. Cell and Mol. Biol.*, v. 3, New York e. a., 1974, p. 191—212.
- Baker W. K.* Position-effect variegation. — "Adv. Genet.", 1968, v. 14, p. 133—169.
- Barlow P.* The influence of inactive chromosomes on human development. — "Humangenetik", 1973, Bd 17, S. 105—136.
- Barlow P., Vosa C. G.* The Y chromosome in human spermatozoa. "Nature", 1970, v. 226, p. 961—962.
- Bianchi N. O., de Bianchi M. S. A.* DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures. — "Chromosoma", 1965, Bd 17, S. 273—290.
- Biochemical and cytogenetic studies on the nucleolus organizing regions (NOR) of man.* — "Humangenetik", 1975, Bd 26, S. 47—59. Aut.: H. Dittes, W. Krone, K. Bross, M. Schmid, W. Vogel.
- Bobrow M., Madan K.* The effects of various banding procedures on human chromosomes, studied with acridine orange. — "Cytogen. Cell Genet.", 1973, v. 12, p. 145—156.
- Bobrow M., Madan K., Pearson P. L.* Staining of some specific regions of human chromosomes particularly the secondary constrictions of No. 9. — "Nature New Biol.", 1972, v. 238, p. 122—124.
- Bostock Ch.* Repetitious DNA. — "Adv. cell biol.", 1971, v. 2, p. 153—223.
- Boue A., Boue J.* Chromosome abnormalities and abortion. — In: Physiology and genetics of reproduction, part B. New York, 1974, p. 317—339.
- Britten R. J., Kohne D. E.* Repeated sequences in DNA. — "Science", 1968, v. 161, p. 521—540.
- Bross K., Krone W.* Ribosomal cistrons and acrocentric chromosomes in man. — "Humangenetik", 1973, B. 18, S. 71—75.
- Brown S. W.* Heterochromatin. — "Science", 1966, v. 151, p. 417—425.
- Caspersson T., Lomakka G., Zech L.* The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability. — "Hereditas", 1971, v. 67, p. 89—102.
- Cat-eye syndrome, a partial trisomy 22.* — "Humangenetik", 1972, Bd 15, S. 150—162. Aut.: E. M. Bühler, K. Mehes, H. Müller, G. R. Stalder.
- de la Chapelle A., Schröder J., Selander R.-K.* In situ localization and characterization of different classes of chromosomal DNA: acridine orange and quinacrine mustard fluorescence. — "Chromosoma", 1973, Bd 40, S. 347—360.
- Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in Vicia faba metaphase chromosomes.* — "Exp. Cell Res.", 1969, v. 58, p. 128—140. Aut.: T. Casperson, L. Zech, E. J. Modest, G. E., Foley, U. Wagh, E. Simonsson.
- Chromosome damage associated with the measles virus in vitro.* — "Hereditas", 1965, v. 54, p. 101—118. Aut.: W. W. Nichols, A. Levan, P. Aula, E. Norrby.
- Chromosome structure as revealed by a combined chemical and immunochemical procedure.* — "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", v. 70, p. 804—807. Aut. R. R. Schreck, D. Warburton, O. J. Miller, S. M. Beiser, B. F. Erlanger.
- Comings D. E.* The structure and function of chromatin. — "Adv. Human Genet.", 1972, v. 3, p. 237—431.
- Comings D. E.* Biochemical mechanisms of chromosome banding and color banding with acridine orange. — In: Chromosome identificati-

- on — technique and application in biology and medicine. New York, London, 1973, p. 293—299.
- Comings D. E. The structure of human chromosomes. — In: Cell Nucleus, v. 1. New York — London, 1974, p. 537—563.
- Comings D. E. Mechanisms of chromosome banding. IV. Optical properties of the Giemsa dyes. — "Chromosoma", 1975, Bd 50, S. 89—110.
- Comings D. E., Avelino E. Mechanisms of chromosome banding. II. Evidence that histones are not involved. — "Exp. Cell Res.", 1974, v. 86, p. 202—206.
- Comings D. E., Avelino E. Mechanisms of chromosome banding. 8. Interaction of methylene blue with DNA and chromatin. — "Chromosoma", 1975, Bd 51, S. 365—379.
- Consistent pattern of binding of anti-adenosine antibodies to human metaphase chromosomes. — "Exp. Cell Res.", 1972, v. 74, p. 288—293. Aut.: V. G. Dev, D. Warburton, O. J. Miller, D. A. Miller, B. F. Erlanger, S. M. Beiser.
- Corneo G., Ginelly E., Polli E. A satellite DNA isolated from human tissues. — "J. Mol. Biol.", 1967, v. 23, p. 619—622.
- Corneo G., Ginelly E. Repeated sequences in human DNA. — "J. Mol. Biol.", 1970, v. 48, p. 319—327.
- Corneo G., Ginelly E., Polli E. Renaturation properties and localization in heterochromatin of human satellite DNAs. — "Biochim. Biophys. Acta", 1971, v. 247, p. 528—534.
- Corneo G., Ginelly E., Zardi L. Satellite and repeated sequences in human DNA. — In: Modern aspects of cytogenetics: constitutive heterochromatin in man. Stuttgart — New York, 1973, p. 29—37.
- Couturier J., Dutrillaux B., Lejeune J. Etude de fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes Q des chromosomes humains. — "C. R. Acad. Sc. Paris", 1973, Ser. D, v. 276, p. 339—342.
- Craig A. P., Shaw M. W. Autoradiographic studies of the human Y chromosomes. — "Chromosoma", 1971, Bd 32, S. 364—377.
- Craig-Holmes A. P., Moore F. B., Shaw M. W. Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. — "Am. J. Hum. Genet.", 1973, v. 25, p. 181—192.
- Curtis D. J., Horobin R. W. Staining banded human chromosomes with Romanovsky dyes: some practical consequences of the nature of the stain. — "Humangenetik", 1975, v. 26, p. 99—104.
- Cytogenetic and linkage studies of a familial 15p+ variant. — "Am. J. Hum. Genet.", 1974, v. 26, p. 535—548. Aut.: F. E. Yoder, B. Bias, D. S. Borgaonkar, G. F. Bahr, I. I. Yoder, O. C. Yoder, H. M. Gomb.
- Dallapiccola B., Ricci N. Observations on specific Giemsa staining of the Y and on selective destaining of the chromosomes. — "Humangenetik", 1975, v. 26, p. 251—255.
- Darlington C. D., La Cour L. Nucleic acid starvation of chromosomes in Trillium. — "J. Genet.", 1940, v. 40, p. 185—213.
- Deux traslocations familiales survenues ensemble chacune de deux soeurs l'unex équilibrée l'autre trisomique partielle 10q. — "Ann. Génét.", 1972, v. 15, p. 85—92. Aut.: J. Grouchi de, C. Finaz, M. Robin, J. Roy.
- Différentiation des chromosomes X par les méthodes de despiralization au 5-bromodéoxyuridine (BÜdR) et de denaturation thermique ménagée. — "Ann. Génét.", 1972, v. 15, p. 271—274. Aut.: L. J. Baranovskaja, A. F. Zakharov, B. Dutrillaux, S. Carpentier, M. Prieur, J. Lejeune.

- Distèche C., Bontemps J.* Chromosome regions containing DNAs of known base composition, specifically evidenced by 2,7-di-t-butyl proflayine. — "Chromosoma", 1974, B. 47, S. 263—281.
- Distinction* between chromosome 4 and chromosome 5 by replication pattern and length of long and short arms. — "Am. J. Hum. Genet.", 1967, v. 19, p. 399—416. Aut.: D. Warburton, D. A. Miller, O. J. Miller, W. R. Breg, A. de Capoa, M. W. Schaw.
- Distinguishing* between the chromosomes involved in Down's Syndrome (trisomy 21) and chronic myeloid leukaemia (Ph) by fluorescence. — "Nature", 1971, v. 230, p. 161—168. Aut.: M. L., O'Riordan, J. A. Robinson, K. E. Buckton, H. J. Evans.
- Distribution* of repetitious DNA in human chromosomes. — "Experientia", 1971, v. 27, p. 964—966. Aut.: E. E. Arrighi, P. P. Saunders, G. F. Saunders, T. C. Hsu.
- Dutrillaux B.* Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. — "Chromosoma", 1973, Bd 41, S. 395—402.
- Dutrillaux B.* Sur la nature et l'origine des chromosomes humains. L'Expansion Scientifique. Paris, 1975.
- Dutrillaux B., Covic M.* Etude de l'acteur influencant la dénaturation thermique ménagée des chromosomes. — "Exp. Cell Res.", 1974, v. 85, p. 143—153.
- Dutrillaux B., Lejeune J.* Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. — "C. R. Acad. Sc. Paris", 1971, Ser. D, v. 2072, p. 2638—2640.
- Dutrillaux B., Lejeune J.* New techniques in the study of human chromosomes: methods and applications. — In: Advances in Hum. Genet., 1975, v. 5, p. 119—156.
- Dutrillaux B., Laurent C., Couturier J., Lejeune J.* Coloration des chromosomes humains par l'acridine orange après traitement par le 5 bromodéoxyuridine. — "C. R. Acad. Sc. Paris", 1971, Ser. D., v. 276, p. 3179.
- Eberle P.* Die Chromosomenstruktur des Menschen in Mitosis und Meiosis. Jena, 1966.
- Edström G. E.* Polytene chromosomes in studies of gene expression. — In: The cell nucleus, vol. 2. Ed. H. Busch. Acad. Press. New York, London, 1974, p. 293—332.
- Eicher E. M.* X-autosome translocations in the mouse: total inactivation versus partial inactivation of the X-chromosome. — "Adv. Genet.", 1970, v. 15, p. 175—259.
- Evans H. J., Buckland R. A., Pardue M. L.* Location of the genes coding for 18 S and 28 S ribosomal RNA in the human genome. — "Chromosoma", 1974, Bd. 48, S. 405—426.
- Ferguson-Smith M. A.* Inherited constriction fragility of chromosome 2. — "Ann. Génét.", 1973, v. 16, p. 29—34.
- Ferguson-Smith M. A., Ferguson-Smith M. E., Dickson M.* The sites and relative frequencies of secondary constrictions in human somatic chromosomes. — "Cytogenetics", 1962, v. 1, p. 325—343.
- Flamm W. G.* Repeated sequences of DNA. — "Intern. Rev. Cytol.", 1972, v. 32, p. 1.
- Fluorescent* staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei. — "Exp. Cell Res.", 1970, v. 61, p. 472—474. Aut.: T. Caspersson, L. Zech, C. Johansson, J. Linsten, M. Hultén.
- Ford E.* Human chromosomes. 1973. Academic Press, New York — London.

- Four patients with trisomy 8 identified by fluorescence and Giemsa banding technique. — "J. Med. Genet.", 1972, v. 9, p. 1—7. Aut.: T. Caspersson, J. Lindstem, L. Zech, K. E. Buckton, W. H. Price.
- Frenster J. N. Biochemistry and molecular biophysics of heterochromatin and euchromatin. — In: Handbook of molecular cytology. Amsterdam, 1969, p. 251—276.
- Frequency of 9qh+ and risk of chromosome aberrations in the progeny of individuals with 9qh+. — "Humangenetik", 1974, Bd. 21, S. 211—216. Aut.: J. Nielsen, U. Friedrich, A. B. Hreidarsson, E. Zeuthen.
- Friedrich U., Nielsen J. D/D translocations in newborn children. — "Ann. Hum. Genet.", 1974, v. 38, p. 97—104.
- Functional organization of the mammalian genome. — In: Chromosome structure and function. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1974, v. 38, p. 303—310. Aut.: J. Bonner, W. T. Garrard, J. Gottesfeld, D. S. Holmes, J. S. Sevall, M. Wilkes.
- Funderburk S. J., Grandall B. F. Dominant piebald trait in a retarded child with a reciprocal translocation and small intercalary deletion. — "Am. J. Hum. Genet.", 1974, v. 26, p. 715—722.
- Gagne R., Laberge C. Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man. — "Exp. Cell. Res.", 1972, v. 73, p. 239—242.
- Gall J. G., Pardue M. L. Formation and detection of RNA—DNA hybrids molecules in cytological preparations. — "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1969, v. 63, p. 378—383.
- Ganner E., Evans H. J. The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement. — "Chromosoma", 1971, Bd. 35, S. 326—341.
- Gartler S. M., Liskay R. M., Gant N. Two functional X chromosomes in human fetal oocytes. — "Exp. Cell Res.", 1973, v. 82, p. 464—466.
- Genest P., Lejeune J. Recherche sur l'origine d'un petit chromosome Y multivalentaire. — "Ann. Génét.", 1972, v. 15, p. 51—53.
- Geraedts J., Pearson P. Specific staining of the human No. 1 chromosome in spermatozoa. — "Humangenetik", 1973, Bd. 20, S. 171—173.
- German J., The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. — "J. Cell. Biol.", 1964, v. 20, p. 37—55.
- German J., Aronian D. Autoradiographic studies of human chromosomes. — "Chromosoma", 1971, Bd. 35, S. 99—110.
- Giannelli F. Human chromosomes DNA synthesis. S. Karger, Basel, München, New York, 1970.
- Gormley I. P., Ross A. Surface topography of human chromosomes examined at each stage during ASG banding procedure. — "Exp. Cell Res.", 1972, v. 74, p. 585—590.
- Gormley I. P., Ross A. Studies on the relationship of a collapsed chromosomal morphology to the production of G-bands. — "Exp. Cell Res.", 1976, v. 98, p. 152—158.
- Gropp A., Hilwig I., Seth P. K. Fluorescence chromosome banding patterns produced by a benzimidazole derivative. — In: Chromosome identification — technique and applications in biology and medicine. Nobel Symposium 23. New York, London, 1973, p. 300—306.
- Hamerton J. L. Human cytogenetics. v. I. General cytogenetics. v. II. Clinical cytogenetics. Academic Press. New York, London, 1971.
- Hampel K. E., Levan A. Breakage in human chromosomes induced by low temperature. — "Hereditas", 1964, v. 51, p. 315—343.
- Hannah A. Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. — "Adv. Genet.", 1951, v. 4, p. 87—125.

- Heitz E.* Die Somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung. — "Z. Zellforsch.", 1934, Bd 20, S. 237—287.
- Henderson A. S., Warburton D., Atwood K. C.* Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. — "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1972, v. 69, p. 3394—3398.
- Hoehn H.* Functional implications of differential chromosome banding. — "Am. J. Hum. Genet.", 1975, v. 27, p. 676—686.
- Holzer S., Rosenkranz W.* Homozygous duplication on long arm of chromosome pair No. 1. — "Humangenetik", 1972, Bd 16, S. 341—343.
- Hook E. B., Hatcher N.* Comparison of quantitative autoradiographic DNA replication patterns of human chromosomes obtained using ³H-deoxycytidine and ³H-thymidine as precursors. — "Ann. Genet.", 1973, v. 16, p. 113—116.
- Hsu T. C.* Longitudinal differentiation of chromosomes. — "Ann. Rev. Genet.", 1973, v. 7, p. 153—176.
- Hsu T. C., Pathak S., Shajer D. A.* Induction of chromosome crossbanding by treating cells with chemical agents before fixation. — "Exp. Cell Res.", 1973, v. 79, p. 484—487.
- Hsu T. C., Arrighi F. E., Saunders G. F.* Compositional heterogeneity of human heterochromatin. — "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1972, v. 69, p. 1464—1466.
- Hsu T. C., Schmid W., Sutcliffe E.* DNA replication sequences in higher animals. — In: The role of chromosomes in development. New York, London, 1964, p. 83—112.
- Hulten M.* Cytogenetic aspects of human male meiosis. Stockholm, 1974.
- Hungerford D. A.* Chromosome structure and function in humans and other vertebrates. — In: Inst. Cancer Res. Sci. Rept., 1972—1973, 18, p. 107—110.
- Identification* of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. — "Chromosoma", 1970, Bd 30, S. 215—227. Aut.: T. Caspersson L. Zech, C. Johansson, E. G. Modest.
- In situ* hybridization of iodinated ribosomal RNA to human chromosomes. — "Exp. Cell Res.", 1974, v. 86, p. 165—166. Aut.: M. T. Yu, L. D. Gohnson, D. Vogelmann, A. S. Henderson.
- Instability* of the paracentric region and selective reduplication of chromosome 2 in man. — "Chromosomes today", 1972, v. 3, p. 138—146. Aut.: M. Fraccaro, J. Lindsten, L. Tiepolo, N. Ricci.
- John N. A., Birnstein M. L., Jones K. W.* RNA—DNA hybrids at the cytological level. — "Nature", 1969, v. 223, p. 582—587.
- Johnson J. D., Donvas A. S., Bonner G.* Chromosomal proteins. — "Int. Rev. Cytol.", Suppl. 4, 1974, p. 273—361.
- Jones K. W.* Satellite DNA. — "J. Med. Genet.", 1973, v. 10, p. 273—281.
- Jones K. W., Corneo G.* Location of satellite and homogeneous DNA sequences on human chromosomes. — "Nature New Biol.", 1971, v. 233, p. 268—271.
- Kikuchi Y., Sandberg A. A.* Chronology and pattern of human chromosome replication. I. Blood leukocytes of normal subjects. — "J. nat. Cancer Inst.", 1964, v. 32, p. 1109—1143.
- Kim M. A.* Identification and characterization of heterochromatin regions in the human metaphase and interphase nuclei. — "Humangenetik", 1974, Bd 21, S. 331—340.

- Kurnit D. M.* DNA helical content during the C-banding procedure. — "Cytogenet. Cell Genet.", 1974, v. 13, p. 313—329.
- Late DNA replication pattern in human haemopoietic cells. A comparative investigation using a high resolution quantitative autoradiography.* — "Exp. Cell Res.", 1968, v. 49, p. 340—358, Aut.: F. Gavosto, L. Pegoraro, P. Maserà, G. Rovera.
- La trisomie 4 p.* — "Ann. Génét.", 1974, v. 17, p. 125—128. Aut.: M. Rethore, B. Dutrillaux, G. Giovanelli, A. Forabosco, B. Dallapiccola, J. Lejeune.
- Latt S. A.* Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. — "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1973, v. 70, p. 3395—3399.
- Laurent C., Biemont M.-Cl., Dutrillaux B.* Sur quatre nouveaux cas de translocation du chromosome X chez l'homme. — "Humangenetik", 1975, Bd 26, S. 35—46.
- Le phenolype (Dr) etude de trois cas de chromosome D en anneau.* — "Ann. Génét.", 1968, v. 11, p. 79—87. Aut.: J. Lejeune, J. Lafeurcade, R. Berger, J. Cruveiller, M.-O. Rethore, B. Dutrillaux, D. Alonyi, H. Jérôme.
- Lejeune J.* Scientific impact of the study of fine structure of chromatids. — In: Chromosome identification — technique and application in biology and medicine. Nobel Symposium 23. New York, London, 1973, p. 16—23.
- Lewandowski R. C., Yunis J. J.* New chromosomal syndromes. — "Am. J. Dis. Child.", 1975, v. 129, p. 515—529.
- Lima-de-Faria A.* Chromosome gradient and chromosome field in *Agapanthus*. — "Chromosoma", 1954, Bd 6, S. 330—370.
- Lima-de-Faria A.* Differential uptake of tritiated thymidine into heterochromatin and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. — "J. Biophys. Biochem. Cyt.", 1959, v. 6, p. 457—466.
- Lima-de-Faria A., Jaworska H.* Late DNA synthesis in heterochromatin. — "Nature", 1968, v. 217, p. 138—142.
- Lima-de-Faria A., Reitalu J., Bergman S.* The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man. — "Hereditas", 1961, v. 47, p. 695.
- Locutions of a human satellite DNA in human chromosomes.* — "Nature New Biol.", 1972, v. 236, p. 244—246. Aut.: G. F. Saunders, T. C. Hsu, M. J. Getz, E. L. Simes, F. E. Arrighi.
- Lubs H., Ruddle F.* Applications of quantitative karyotyping to chromosome variation in 4400 consecutive newborns. — In: Human population cytogenetics. Edinburgh, 1970, p. 119—142.
- Lyon M. F.* X-chromosome inactivation and develop, mental patterns in mammals. — "Biol. Rev.", 1972, v. 47, p. 1—35.
- Lyon M. F.* Evolution of X-chromosome inactivation in mammals. — "Nature", 1974, v. 250, p. 651—653.
- Madan K., Bobrow M.* Structural variation in chromosome No. 9. — "Ann. Genet.", 1974, v. 17, p. 81—86.
- Manolov G., Manolova Y., Levan A.* The fluorescence pattern of the human karyotype. — "Hereditas", 1971, v. 69, p. 273—286.
- Matsui S.-I., Sasaki M.* Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. — "Nature", 1973, v. 246, p. 148—150.
- McKay R. D. G.* The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. — "Chromosoma", 1973, Bd 44, S. 1—14.
- McKenzie W. H., Lubs H. A.* Human Q and C chromosomal variations: distribution and incidence. — "Cytogen, and Cell Genet.", 1975, v. 14, p. 97—115.

- McKusick V. A. On the X chromosome of man. — "Quart. Rev. Biol.", 1962, v. 37, p. 69—175.
- McKusick V. A. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-phenotypes. 4-th ed. Johns Hopkins University Press. Baltimore, 1975.
- Meisner L. F., Chuprevich T. W., Inhorn S. L. Giemsa banding specificity. — "Nature New Biol.", 1973, v. 245, p. 145—147.
- Miles C. P., O'Neill F. Prominent secondary constrictions in a pseudo-diploid human cell line. — "Cytogenetics", 1966, v. 5, p. 321—334.
- Miller O. J. Autoradiography in human cytogenetics. — "Adv. Genet.", 1970, v. 1, p. 35.
- Miller D. A., Warburton D., Miller O. J. Clustering in deleted shortarm length among 25 cases with a Bp-chromosome. — "Cytogenetics", 1969, v. 8, p. 109—116.
- Müller Hj., Klinger H. P., Glasser M. Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual. — "Cytogen. and Cell Genet.", 1975, v. 15, p. 239—255.
- Nielsen J., Friedrich U., Hreidarsson A. B. Frequency of deletion of short arm satellites in acrocentric chromosomes. — "J. Med. Genet.", 1974, v. 11, p. 177—180.
- Nielsen J., Tsuboi T., Friedrich U. Synchronous and asynchronous DNA-synthesis of two Y chromosomes in patients with karyotype 47, XYY and 48, XXYY. — "Hereditas", 1970, v. 64, p. 139—142.
- Ockey C. H. Human chromosome identification and the pattern of DNA replication in fibroblasts from an XXY male. A quantitative autoradiographic study of early and late synthesis. — "Cytogenetics", 1969, v. 8, p. 272—295.
- Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- Ohno S., Makino S. The single-X nature of the sex chromatin in man. — "Lancet", 1961, v. 1, p. 78—79.
- Okada T. A., Comings D. E. Mechanism of chromosome banding. III. Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of meiotic chromosomes. — "Chromosoma", 1974, v. 48, p. 65—71.
- On the relevance of non-histone proteins to the production of Giemsa banding pattern on chromosomes. — "Humangenetik", 1974, Bd 21, S. 227—236. Aut. W. Vogel, J Faust, M. Schmid, J.—W. Siebers.
- O'Neill F. J., Miles C. P. Chromosome changes in human cells induced by herpes simplex, types I and 2. — "Nature", 1969, v. 223, p. 851—852.
- Pardo D., Luciani J.-M., Stahl A. Localisation, par hybridation in situ, des gènes des arm 28S et 18S dans les chromosomes somatiques humains. — "Ann. Génét.", 1975, v. 18, p. 105—109.
- Pardue M. L., Gall J. G. Chromosome structure studies by nucleic acid hybridization in cytological preparations. — "Chromosomes today", 1971, v. 3, p. 47—52.
- Paris Conference (1971): Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, VII: 7, 1972, The National Foundation, New York.
- Paris Conference (1971), Supplement (1975): Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, XI, 9, 1975, The National Foundation, New York.

- Passarge E., La Rock J., German J.* Autoradiographic studies of human chromosomes. V. Non-random localization of DNA synthesis during the final minutes of the S-Period. — "Chromosoma", 1969, Bd 28, S. 37—47.
- Palmer C. G.* 5-bromodeoxyuridine — induced constrictions in human chromosomes. — "Canad. J. Genet. Cytol.", 1970, v. 12, p. 816—830.
- Palmer C. G., Funderburk S.* Secondary constrictions in human chromosomes. "Cytogenetics", 1965, v. 4, p. 261—276.
- Pearson P. S., Bobrow M., Vosa C. G.* Techniques for indentifying Y chromosome in human interphase nuclei. — "Nature", 1970, v. 226, p. 78—80.
- Perry P., Wolff S.* New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. — "Nature", 1974, v. 251, p. 156.
- Preiffer R. A., Büttinghaus K., Struck H.* Partial trisomy 14 following a balanced reciprocal translocations $t(14q-; 21q+)$. — "Humangenetik", 1973, Bd 20, S. 187—189.
- Preicentric inversions of human chromosomes 9 and 10.* — "Am. J. Hum. Genet.", v. 26, p. 746. Aut.: A. de la Chapelle, J. Schröder, K. Stenstrand, J. Fellman, R. Herva, M. Saarni, I. Anttolainen, I. Tallila, L. Tervila, L. Husa, G. Tallqvist, E. B. Robson, P. J. L. Cook, R. Sanger.
- Polani P. E.* Abnormal sex chromosomes and mental disorder. — "Nature", 1969, v. 223, p. 680—686.
- Populations of repeated DNA sequences in the human genome.* — "J. Mol. Biol.", 1972, v. 63, p. 323—334. Aut.: G. F. Saunders, Sh. Shirakawa, P. P. Saunders, F. E. Arrighi, T. Hsu.
- Possible complex translocation $t(9: 14: 13)(q12: p1?: q31)$ in mother of a children with 9p-trisomy syndrome.* "Humangenetik", 1974, Bd 25, S. 83—92. Aut.: H. Fujita, T. Abe, K. Yamamoto, J. Furuyama.
- Prescott D. M.* Structure and replication on eukaryotic chromosomes. — "Adv. cell biol.", 1970, v. i, p. 57—117.
- Price P. M., Conover J. H., Hirschhorn K.* Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes. — "Nature", 1972, v. 237, p. 340—342.
- Priest J. H.* The replication of human heterochromatin in serial culture. — "Chromosoma", 1968, Bd 24, S. 438—455.
- Rae P. M. M.* The distribution of repetitive DNA sequences in chromosomes. — "Adv. cell mol. biol.", 1972, v. 2, p. 109—149.
- Rao P. N., Johnsen R. T.* Induction of chromosome condensation in interphase cells. — "Adv. cell mol. biol.", 1973, v. 3, p. 135—189.
- Raposa T., Natarajan A. T.* Fluorescence banding pattern of human and mouse chromosomes with a benzimidazole derivative (Hoechst 33258). — "Humangenetik", 1974, Bd 21, S. 221—226.
- Rethore M.-O., Dutrillaux B., Lejeune J.* Translocation 46, XX, $t(15: 21)(q13: q22, 1)$ chez la mère de deux enfants atteints de trisomie 15 et de monosomie 21 partielles. — "Ann Génét.", 1973, v. 16, p. 271—275
- Robinson J., Buckton K. E.* Quinacrine fluorescence of variant and abnormal human Y chromosomes. — "Chromosoma", 1971, Bd 35, S. 342—352.
- Rotterdam Conference (1974):* Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI, 3, 1975. The National Foundation. New York.
- Rodman T. C.* Human chromosome banding by Feulgen stain aids in localizing classes of chromatin. — "Science", 1974, v. 184, p. 171—173.

- Rowley J. D.* A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. — "Nature", 1973, v. 243, p. 290—293.
- Ruddle F. H.* Linkage analysis using somatic cell hybrids. — "Advances Human Genet.", 1972, v. 3, p. 173—235.
- Saksela E., Moorhead P. S.* Enhancement of secondary constrictions and the heterochromatic X in human cells. — "Cytogenetics", 1962, v. 1, p. 225—244.
- Sandsrom M. M., Jenkins E. C.* A 17p marker chromosome familial study. — "Ann. Génét.", 1973, v. 16, p. 267—269.
- Sasaki M. S., Makino S.* The demonstration of secondary constrictions in human chromosomes by means of a new technique. — "Am. J. Hum. Genet.", 1963, v. 15, p. 24—33.
- Schildkraut C. L., Maio J. J.* Studies on the intranuclear distribution and properties of mouse satellite DNA. — "Biochim. biophys. acta", 1968, v. 161, p. 76—93.
- Schinzl A., Hayashi K., Schmid W.* Mosaic-trisomy and pericentric inversion of chromosome 9 in a malformed boy. — "Humangenetik", 1974, Bd 25, S. 171—177.
- Schmid W.* DNA replication patterns of human chromosomes. — "Cytogenetics", 1963, v. 2, p. 175—193.
- Schmid W.* Autoradiography of human chromosomes. — In: Human chromosome methodology, 1st ed. New York, 1965, London, p. 91—110.
- Schmid W.* Heterochromatin in mammals. — "Arch. Klaus-Stift. Veterb. — Forsch.", 1967, v. 41, p. 1—60.
- Schnedl W.* Late DNA replication pattern of human chromosomes determined by means of H³-deoxycytidine. — "Humangenetik", 1973, Bd 20, S. 55—58.
- Schnedl W.* Analysis of the human karyotype by the recent banding techniques. — "Arch. Génét.", 1973, v. 46, p. 1—34.
- Schoepflin G. S., Centerwall W. R.* 48, XYYY: a new syndrome? — "J. Med. Genet.", 1972, v. 9, p. 356—380.
- Schwanitz G., Rott H.-D., Köllermann M. W.* Vergrößerte sekundäre Einschnürung des Chromosomes C₉ bei Mutter und Kind. — "Humangenetik", 1971, Bd 11, S. 258—263.
- Schwarzacher H. G.* Chromosomes in mitosis and interphase. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976.
- Schwinger E., Sperling H., Schwieder R.* Strongly fluorescent bands in metaphase and interphase. — "Humangenetik", 1974, Bd 22, S. 127—132.
- Seabright M.* A rapid banding technique for human chromosomes. — "Lancet", 1971, v. 2, p. 971—972.
- Ségrégation* familiale d'une t (5p—; 13q+) analyse complémentaire à partir de spécimens préservés dans l'azote liquide. — "Ann. Génét.", 1972, v. 15, p. 57—60. Aut.: S. Carpentier, B. Dutrillaux, J. Lafourcade, R. Berger, M.-O. Rethore, J. Lejeune.
- Selanger R.-K.* Interaction of quinacrine mustard with mononucleotides and polynucleotides. — "Biochem. J.", 1973, v. 131, p. 749—755.
- Selander R.-K., Chapelle de la A.* The fluorescence of quinacrine mustard with nucleic acids. — "Nature New Biol.", 1973, v. 245, p. 240—244.
- Seth P. K., Kunze W. P.* Differential chromosomal staining in *Bos taurus* (Cattle). — "Cytologia", 1974, v. 39, p. 373—378.

- Shiraishi Y.* Differential reactivity in mammalian chromosomes. I. Relation between special segments and late-labeling patterns of DNA synthesis in human X-chromosomes. — "Chromosoma", 1972, Bd 36, S. 211—220.
- Solari A. J.* The molecular organization of the chromatin fiber. — In: The cell nucleus, vol. 1. Ed. by H. Busch. Acad. Press., New York — London, 1974, 493.
- Steele M. W.* Autoradiography may be unreliable for identifying human chromosomes. — "Nature", 1969, v. 221, p. 1114—1116.
- Steffensen D. M., Dury P., Prensly W.* Localization of the 5 S ribosomal RNA genes on human chromosome I. — "Nature", 1974, v. 252, p. 741—743.
- Structural genes adjacent to interspersed repetitive DNA sequences.* — "Cell", 1975, 4, 3, p. 217—238. Aut.: Davidson E. H., Hongh B. R., Klein W. N. and Britten R. J.
- Stubblefield E.* The kinetics of DNA replication in chromosomes. In: The cell nucleus, vol. 2. Ed. by H. Busch. Acad. Press, New York — London, 1974, 149—162.
- Subdivision of the human Y chromosome.* — "Humangenetik", 1974, Bd 24, S. 59—65. Aut.: S.M. Jalal, R. A. Pfeifer, S. Pathak, T. S. Hsu.
- Sumner A. T.* Involvement of protein disulphides and sulphhydryls in chromosome banding. — "Exp. Cell Res.", 1974, v. 83, p. 438—442.
- Sumner A. T., Evans H. J., Buckland R. A.* Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. I. The effects of fixative in methanol-acetic acid. — "Exp. Cell Res.", 1973, v. 81, p. 214—222.
- Synchrony of chromosome duplication.* — "Nature", 1966, v. 209, p. 537. Aut.: C. W. Gilbert, L. G. Lajtha, S. Muldal, C. H. Ockey.
- Synthesis of deoxyribonucleic acid on X-chromosomes of an XXXXY male.* — "Nature", 1963, v. 197, p. 251—252. Aut.: J. Rowley, S. Muldal C. W. Gilbert, L. J. Lajtha, M. Fraccaro, K. Kaijser.
- Taylor J. H.* The structure and duplication of chromosomes. In: Genetic organization. Acad. Press. New York — London, 1969, v. I, p. 163—221.
- Takagi N., Sanberg A. A.* Chronology and pattern of human chromosome replication. VIII. Behavior of the X and Y in early S-phase. — "Cytogenetics", 1968, v. 7, p. 135—143.
- The biology of isolated chromatin.* — "Science", 1968, v. 159, p. 17—56. Aut.: J. Bonner, M. E. Dahmus, D. Fambrough, R. C. Haung, K. Marushige, Y. N. Tuan.
- The chromosomal location of human satellite DNA.* — "Chromosoma", 1973, Bd 42, S. 445—451. Aut.: K. W. Jones, J. Prosser, G. Corneo, E. Ginelly.
- The chromosomal localization of human satellite DNA I.* — "Chromosoma", 1974, Bd 49, S. 161—171. Aut.: K. W. Jones, I. F. Purdom, J. Prosser, G. Corneo.
- The location of four human satellite DNAs on human chromosomes.* — "Exp. Cell Res.", 1975, 92, I, p. 148—158. Aut.: G. R. Gosden, A. R. Mitchell, R. A. Bucklend, R. P. Clauton, H. J. Evans.
- The mechanism of C- and G-banding of chromosomes.* — "Exp. Cell Res.", 1973, v. 77, p. 469—493. Aut.: D. E. Comings, E. Avelino, T. A. Okada, H. E. Wyandt.
- The 9p- syndrome.* — "Ann. Génét.", 1976, v. 19, p. 11—16. Aut.: O. S. Alfi, G. N. Donnell, P. W. Allderdice. A. Drencsenyi.

- The sex chromosomes of the Chinese hamster: constitutive heterochromatin deficient in repetitive DNA sequences. — "Cytogen. Cell Genet.", 1974, v. 13, p. 268—274. Aut.: F. E. Arrighi, T. C. Hsu, S. Pathak, H. Sawada.
- Therman E., Patau K. Abnormal X chromosomes in man: origin, behavior and effects. — "Humangenetik", 1974, Bd 25, S. 1—16.
- Therman E., Sarto G. E., Patau K. Center for Barr body condensation on the proximal part of the human Xq: a hypothesis. — "Chromosoma", 1974, Bd 44, S. 361—366.
- Translocation X sur autosome et replication tardive. A propos d'une observation avec étude des X en autoradiographie et apres traitement au BUdR. — "Humangenetik", 1975, Bd 26, S. 25—34. Aut.: S. Gilgenkranz, G. Mauuary, B. Dutrillaux, G. Masocco.
- Weisblum B. Why centric regions of quinacrine-treated mouse chromosomes show diminished fluorescence. — "Nature", 1973, v. 246, p. 150—151.
- Weisblum B. Fluorescent probes of chromosomal DNA structure: three classes of acridines. — In: Chromosome structure and function. Cold Spring harbor Symp. Quant. Biol., 1974, v. 38, p. 441—449.
- Weisblum B., Haenssler E. Fluorometric properties of the dibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. — "Chromosoma", 1974, Bd 46, S. 255—260.
- Weisblum B., Haeseth P. L., Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidilate-rich regions in DNA — "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1972, v. 69, p. 629—632.
- Wyandt H. E., Hecht F. Human Y-chromatin. I. Dispersion and condensation. — "Exp. Cell Res.", 1973, v. 81, p. 453—461.
- 48, XXXX/49 XXXXX mosaic: asynchronies among the late-replicating X chromosomes. — "Cytogenetics", 1968, v. 7, p. 249—259. Aut.: N. Ricci, B. Dallapiccola, B. Ventimiglia, L. Tiepolo, M. Fraccaro.
- Yasmineh W. G., Yunis J. J. Localization of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin. — "Exp. Cell Res.", 1970, v. 59, p. 69—75.
- Yunis E., Silva R., Giraldo A. Trisomy 10p. — "Ann. Génét.", 1976, v. 19, p. 57—60.
- Yunis J. J., Hook E. B., Mayer M. Deoxyribonucleic acid replication pattern of trisomy D₁. — "Lancet", 1964, v. 2, p. 286—288.
- Yuins J. J., Sanchez O. G-banding and chromosome structure. — "Chromosoma", 1973, Bd 44, S. 15—23.
- Yunis J. J., Yasmineh W. G. Model for mammalian constitutive heterochromatin. — "Adv cell mol. biol.", 1972, v. 2, p. 1—46.
- zur Hausen H. Chromosomal changes of similar nature in seven established cell lines derived from peripheral blood of patients with leukaemia. — "J. Nat. Cancer. Inst.", 1967, v. 38, p. 683—696.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава I. Линейная дифференцированность — принцип организации хромосом эукариотов	5
Глава II. Дифференциальная конденсация хромосом	17
Введение	17
Интерфазные хромосомы	23
Профазные хромосомы	30
Метафазные хромосомы	30
Мейотические хромосомы	48
Заключение	50
Глава III. Генетическая дифференцированность хромосом	52
Введение	52
Генетическое картирование хромосом	54
Фенотипический эффект хромосомного дисбаланса	58
Заключение	66
Глава IV. Дифференцированность репликационной организации хромосом	68
Введение	68
Межхромосомная асинхронность репликации ДНК	70
Внутрихромосомная последовательность репликации ДНК	74
Последовательность репликации ДНК в измененных хромосомах	83
Изучение последовательности репликации ДНК с применением 5-бромдезоксиуридина	89
Заключение	93
Глава V. Химическая дифференцированность хромосом	95
Введение	95
Гетерогенность ДНК	103
Хромосомная локализация фракций ДНК	111
Заключение	126
Глава VI. Дифференциальная окрашиваемость хромосом	128
Введение	128
Дифференциальная окрашиваемость хромосом флуорохромами (Q-окрашивание)	130
Дифференциальная окрашиваемость хромосом красителем Гимзы	136
Комбинированное применение методов и другие варианты окрасок	143
	191

Применение дифференциальных окрасок в клинической цитогенетике	148
Заключение	152
Глава VII. Единство разных сторон линейной дифференцированности хромосомы эукариотов	153
Введение	153
Взаимосвязь состояния конденсации, генетической активности и времени репродукции	153
Химические основы дифференцированности хромосом	157
Дифференциальная окрашиваемость — отражение единства разных сторон линейной дифференцированности хромосомы	163
Заключение	174
Литература	177

ИБ № 889.

Захаров Александр Федорович

ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Редактор *Е. М. Кедрова*

Художественный редактор *С. М. Большакова.*

Корректор *З. П. Бабуева.*

Техн. редактор *А. М. Миронова.*

Обложка художника *С. В. Митурича*

Сдано в набор 19/X 1976 г. Подписано к печати 21/I 1977 г. Формат бумаги 84×108^{1/32} 6,0 печ. л. (условных 10,08 л.) 10,75 уч.-изд. л. Бум. тип. № 1. Тираж 3000 экз. Т-01313 МН-71 Цена 1 р. 61 к.

Издательство «Медицина», Москва, Петроверигский пер., 6/8
 Зак. 814. Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

Г р. 61 к.



»МЕДИЦИНА« 1977