



ریخت‌شناسی کروموزوم‌های انسان و اصول سیتورژنتیک بالینی

(همراه با اطلس کروموزوم‌ها و تست‌های کنکور کارشناسی ارشد و دکتری)

دکتر بهرام گلستانی ایمانی

(عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد ارومیه)

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۹
فصل اول: ساختمان کروموزوم	
کروماتین	۱۳
هیستون‌ها	۱۳
نوکلئوزوم‌ها	۱۴
نقش هیستون H1	۱۵
DNA رابط	۱۶
رشته ۳۰ نانومتری	۱۷
ساختار بسیار منظم	۱۷
کروموزوم میتوزی	۱۸
سانترومر	۱۹
تلومرها	۱۹
کروموزوم اینترفازی	۱۹
هتروکروماتین	۱۹
یوکروماتین	۲۰
حساسیت شدید نسبت به DNase I	۲۰
متیلاسیون CpG	۲۱
تنوع هیستون‌ها و تغییر آن‌ها	۲۲
فصل دوم: ریخت‌زایی	
شناسایی چشمی کروموزوم‌ها (شکل ۱ تا ۱۱)	۲۵
تشخیص مورفومتریک کروموزوم‌ها (شکل ۱۶)	۲۷
موقعیت فضایی کروموزوم‌ها در صفحه متافازی (شکل ۱۲)	۳۰
تغییرپذیری کروموزوم‌ها (۱۳ تا ۱۷)	۳۱
فصل سوم: ریخت‌شناسی رنگ‌آمیزی افتراقی کروموزوم‌ها	
رنگ‌آمیزی‌های افتراقی (شکل ۱)	۴۷
رنگ‌آمیزی Q (شکل ۲ تا ۶)	۴۸
رنگ‌آمیزی G (شکل ۸ تا ۱۱)	۵۰

۵۱.....	رنگ آمیزی R (شکل ۱۲ تا ۱۹).....
۵۲.....	رنگ آمیزی C (شکل ۲۰ تا ۲۳).....
۵۳.....	رنگ آمیزی انتخابی.....
۵۴.....	رنگ آمیزی ترکیبی و متوالی.....
۵۵.....	ویژگی های کمی (تعدادی) کروموزوم ها (شکل ۲).....
۵۷.....	پلی مورفیسم کروموزوم ها.....

فصل چهارم: تغییرات ریخت شناسی کروموزوم ها

۷۹.....	راه های تغییرات موفولوژی کروموزوم ها.....
۸۰.....	تراکم تأخیری کروموزوم (شکل ۱ تا ۴).....
۸۱.....	متراکم شدن زودهنگام کروموزوم ها (شکل ۵ تا ۱۱).....

فصل پنجم: تکثیر کروموزوم ها

۹۳.....	اصول مطالعه تکثیر کروموزوم ها (اشکال ۵ تا ۱۲).....
۹۴.....	DNA های الگوی نشان دار شده با رادیواکتیو.....
۹۵.....	DNA های الگوی برمی شده.....
۹۶.....	ثبات و استمرار همانند سازی DNA در تقسیمات سلولی (شکل ۱ تا ۴، ۵ و ۶).....
۱۰۰.....	استمرار همانند سازی DNA در دسته کروموزوم ها و در طول آنها (شکل ۸ تا ۱۵).....

فصل ششم: انحرافات کروموزومی

۱۱۷.....	طبقه بندی عمومی.....
۱۱۸.....	انحرافات یا نوترتیبی های ساختاری (structural rearrangements یا structural aberration).....
۱۲۰.....	۱ - انحرافات کروموزومی (شکل ۱ تا ۷ و ۲۱ تا ۲۴).....
۱۲۰.....	قطعات یا فراگمنت های جفتی.....
۱۲۲.....	تبادلات داخل کروموزومی.....
۱۲۲.....	حلقه یا رینگ های بدون سانترومر.....
۱۲۳.....	کروموزوم های حلقوی.....
۱۲۴.....	وارونگی پری سنتریک و پاراسنتریک.....
۱۲۵.....	تبادلات یا جابجایی های بین کروموزومی.....
۱۲۵.....	جابجایی دوطرفه.....
۱۲۶.....	جابجایی رابرت سونی.....
۱۲۷.....	کروموزوم های پلی سنتریک یا چند سانترومری.....
۱۲۹.....	۲ - انحرافات کروماتیدی (شکل های ۸ تا ۱۳، ۱۷ تا ۲۰).....

۱۲۹.....	فراگمنت‌های تکی
۱۲۹.....	تبادلات داخل بازویی داخل کروموزومی
۱۳۰.....	تبادلات داخل کروماتیدی
۱۳۱.....	تبادلات بین کروماتیدی
۱۳۲.....	تبادلات بین بازویی داخل کروموزومی
۱۳۳.....	تبادلات بین کروموزومی
۱۳۴.....	تبادلات کروماتید-کروماتیدی
۱۳۵.....	تبادلات کروماتید-ایزوکروماتیدی
۱۳۶.....	۳- انحرافات کروموزومی خود به خودی و القایی
۱۳۶.....	حذف‌شدگی
۱۳۶.....	مضاعف‌شدگی‌ها
۱۳۷.....	کروموزوم‌های نشانگر
۱۳۸.....	ایزوکروموزوم‌ها
۱۴۰.....	درج‌شدگی‌ها
۱۴۰.....	موزائیسیم
۱۴۳.....	۴- انحرافات عددی کروموزوم‌ها
۱۴۳.....	تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی
۱۴۳.....	آنوپلوئیدی
۱۴۵.....	اصول بررسی و ثبت انحرافات کروموزومی

فصل هفتم: روش‌های آزمایشگاهی در سیتوژنتیک پزشکی

۱۷۵.....	۱- کشت لنفوسیت‌های خون محیطی انسان
۱۷۵.....	روش استفاده از پلاسمای خون محیطی عاری از اریتروسیت (macro method)
۱۷۵.....	روش استفاده از خون کامل (half-micro method)
۱۷۵.....	روش استفاده از مقدار بسیار کم خون (micro method)
۱۷۶.....	۲- تهیه لام‌های کروموزوم‌ها
۱۷۶.....	تهیه لام‌های کروموزوم‌های پرومتافازی
۱۷۷.....	۳- تهیه رنگ‌ها و رنگ‌آمیزی روتین لام‌ها
۱۷۷.....	رنگ‌آمیزی لام‌ها با آزور-اٹوزین
۱۷۷.....	رنگ‌آمیزی لام‌ها با گیمسا
۱۷۷.....	رنگ‌آمیزی لام‌ها با فولگن
۱۷۸.....	رنگ‌آمیزی لام‌ها با کربولیک فوشین

رنگ آمیزی لام‌ها با لاکتاستوآورسئین	۱۷۸
۴- رنگ آمیزی افتراقی (نواربندی) کروموزوم‌ها	۱۷۸
روش نواربندی Q	۱۷۸
رنگ آمیزی لام‌ها با آکرشین-ایپریت	۱۷۸
رنگ آمیزی لام‌ها با فلوروکروم	۱۷۹
روش نواربندی G	۱۷۹
رنگ آمیزی ساده (بدون هیچ عملیات مقدماتی)	۱۸۰
رنگ آمیزی و نواربندی G با استفاده از سزیم کلراید (CsCl)	۱۸۰
رنگ آمیزی و نواربندی G با استفاده از تریپسین	۱۸۰
رنگ آمیزی و نواربندی G با استفاده از محلول نمکی سدیم سترات (SSC)	۱۸۰
روش R	۱۸۰
رنگ آمیزی T با استفاده از سازوکار حرارتی و رنگ گیمسا یا آکریدین نارنجی	۱۸۰
* نواربندی T با دنا توره کردن حرارتی	۱۸۱
نواربندی R با استفاده از باریم هیدروکسید $[Ba(OH)_2]$	۱۸۲
نواربندی R-T با استفاده از آکریدین نارنجی	۱۸۲
نواربندی C (نواربندی سانترومری)	۱۸۲
نواربندی C با استفاده از سدیم هیدروکسید	۱۸۲
نواربندی C با استفاده از باریم هیدروکسید	۱۸۳
رنگ آمیزی انتخابی	۱۸۳
روش G-11 (یا Gimsa-11)	۱۸۳
رنگ آمیزی نقره مناطق سازمان دهنده هستکی کروموزوم‌ها	۱۸۳
۵- روش مطالعه و بررسی تکثیر کروموزوم‌ها	۱۸۴
روش رادیواتوگرافی	۱۸۴
روش استفاده از DNA الگوی برم شده	۱۸۴
روش استفاده از BrdU با رنگ آکریدین نارنجی	۱۸۴
روش استفاده از BrdU و فلوروکروم	۱۸۵
روش استفاده از BrdU، فلوروکروم Hoeshst 33258 و رنگ گیمسا	۱۸۵
روش استفاده از BrdU با شیوه حرارتی	۱۸۶
روش استفاده از BrdU و آکریدین نارنجی به جای فلوروکروم Hoeshst 33258	۱۸۶

فصل هشتم: هیبریداسیون فلورسانس درجا (FISH)

روش شناسی	۱۸۹
-----------	-----

۱۹۰.....	انواع پروب
۱۹۳.....	انواع نمونه
۱۹۳.....	کاربردهای بالینی
۱۹۴.....	فن‌آوری‌های مرتبط و اختصاصی
۱۹۴.....	۱- دورگه سازی ژنومی مقایسه‌ای (CGH) روی سلول‌های متافازی
۱۹۶.....	۲- M- FISH یا FISH چندگانه (Multiplex FISH)
۱۹۸.....	۳- آنالیز mBAND
۱۹۹.....	۴- Fiber FISH
۱۹۹.....	۵- Primed In Situ labeling (PRIN)
۲۰۰.....	۶- FISH معکوس (Reverse FISH)

فصل نهم: ناهنجاری‌های کروموزوم

۲۰۵.....	بروز ناهنجاری‌های کروموزومی
۲۰۶.....	نشانگان داون (تریزومی ۲۱)
۲۰۶.....	ویژگی‌های بالینی
۲۰۶.....	شرح حال و سیر طبیعی
۲۰۸.....	یافته‌های کروموزومی
۲۱۲.....	خطر بازگشت
۲۱۲.....	نشانگان پاتائو (تریزومی ۱۳) و نشانگان ادواردز (تریزومی ۱۸)
۲۱۴.....	تریپلوئیدی
۲۱۴.....	هیپوملانوز ایتو
۲۱۵.....	اختلالات کروموزوم‌های جنسی
۲۱۵.....	نشانگان کلاین فلتر (47,XXY)
۲۱۵.....	مشخصات بالینی
۲۱۶.....	یافته‌های کروموزومی
۲۱۶.....	نشانگان ترنر (45,X)
۲۱۶.....	مشخصات بالینی
۲۱۷.....	یافته‌های کروموزومی
۲۱۸.....	زنان XXX
۲۱۸.....	مردان XYY
۲۱۹.....	نشانگان X شکننده
۲۱۹.....	ویژگی‌های بالینی

۲۱۹.....	کروموزوم X شکننده
۲۲۰.....	نقص مولکولی
۲۲۲.....	مشاوره‌ی ژنتیک و نشانگان X شکننده
۲۲۳.....	حذف کروموزومی و نشانگان‌های ریز حذفی
۲۲۳.....	ریز حذف‌ها
۲۲۴.....	درس‌هایی از نشانگان‌های ریزحذفی
۲۳۱.....	اختلالات کروموزوم و فنوتیپ‌های رفتاری
۲۳۱.....	اختلالات تمایز جنسی
۲۳۲.....	هرمافرودیسم واقعی
۲۳۲.....	هرمافرودیسم کاذب مردانه
۲۳۴.....	هرمافرودیسم کاذب زنانه
۲۳۵.....	نشانگان‌های شکستگی کروموزومی
۲۳۵.....	آناکسی تلائیکتازی
۲۳۶.....	نشانگان بلوم
۲۳۶.....	آنمی فانکونی
۲۳۸.....	زرودرما پیگمنتوزا
۲۳۸.....	شکستگی کروموزوم و تبادل کروماتید خواهری
۲۳۹.....	نشانه‌ها و شاخص‌های آنالیز کروموزومی
۲۳۹.....	ناهنجاری‌های چندگانه مادرزادی
۲۴۰.....	مشکلات یادگیری و ذهنی بدون توضیح
۲۴۰.....	ابهام جنسی
۲۴۱.....	ناباروری و سقط مکرر
۲۴۱.....	مرگ نوزادی/ مرده زایی بدون توضیح
۲۴۲.....	بدخیمی و نشانگان شکستگی کروموزوم
۲۴۳.....	فهرست منابع برای مطالعه بیشتر

فصل اول
ساختمان کروموزوم

کروماتین

طول کلی DNA در سلول یوکاریوت وابسته به نوع سلول می‌باشد، اما به‌طور کلی می‌تواند هزاران بار بزرگ‌تر از ژنوم سلول پروکاریوت باشد و از واحدهای مشخصی به نام کروموزوم تشکیل شده است (۴۶ عدد در انسان). تصور می‌شود که DNA در هر کروموزوم یک مولکول منفرد خطی باشد که می‌تواند تا حد چند سانتی‌متر طول داشته باشد. تمام این DNA باید درون هسته جای گیرد. در واقع در فشرده‌ترین شکل خود کروموزوم‌ها تراکم بسیار بالایی از DNA دارند. این شکل بسته‌بندی شدن از طریق ایجاد یک ساختار فوق‌العاده پیچیده از DNA و پروتئین به نام کروماتین شکل می‌گیرد (مجموعه نوکلئوپروتئین). بیش از ۵۰٪ توده کروماتین، پروتئین است. کروموزوم‌ها میزان فشردگی خود را در مراحل مختلف چرخه سلولی تغییر می‌دهند که می‌تواند از حد کروموزوم با تراکم بسیار بالا در متافاز تا حد ساختاری با تراکم کم در مرحله اینترفاز باشد. این مسئله حضور سطوح مختلف سازمان‌یافتگی را در کروماتین نشان می‌دهد [۱ و ۲].

هیستون‌ها

بیشتر پروتئین‌ها در کروماتین از هیستون‌ها تشکیل شده‌اند که دارای ۵ خانواده یا گروه می‌باشند: H4, H3, H2B, H2A که به‌عنوان هیستون‌های مرکزی (اصلی)^۱ شناخته می‌شوند و H1. هیستون‌های مرکزی پروتئین‌های کوچکی هستند با وزن ۱۰ تا ۲۰ kDa و هیستون‌های گروه H1 کمی بزرگ‌تر بوده و وزن حدود ۲۳ kDa دارند. تمام پروتئین‌های هیستونی بار مثبت زیادی دارند و بین ۲۰ تا ۳۰ درصد توالی آن‌ها آمینواسیدهای بازی لیزین و آرژینین دارد. این بدان معناست که هیستون‌ها خیلی قوی به DNA با بار منفی متصل می‌شوند تا کروماتین بسازند.

اعضای هر گروه خاص از هیستون‌ها در گونه‌هایی که ارتباطی با همدیگر دارند به‌شدت حفظ می‌شوند به‌عنوان مثال بین گیاهان و حیوانات، این مسئله دلیلی است بر نقش مهم هیستون‌ها در کروماتین. در یک گونه مشخص هیستون‌های مشابه از یک گروه خاص وجود دارند که این هیستون‌ها در بافت‌های مختلف و یا در مراحل مختلف تکاملی حضور دارند. مشابهت زیادی از نظر توالی بین خانواده‌های مختلف هیستون‌ها وجود ندارد اما مطالعات ساختاری نشان می‌دهند که تمامی خانواده‌ها

1 Core histones

ساختار سوم مشابه یکدیگر دارند و این مسئله این موضوع را بیان می‌کند که تمام هیستون‌ها از نظر تکاملی با همدیگر در ارتباط هستند.

هیستون‌های گروه H1 به عللی با هیستون‌های سایر گروه‌ها تفاوت دارند؛ علاوه بر آن‌که اندازه بزرگ‌تری دارند تغییرات موجود در توالی آن‌ها بین و درون گونه‌ها بیشتر از بقیه می‌باشد. هیستون H1 راحت‌تر از توده کروماتینی به دست می‌آید و به نظر می‌رسد که از نظر مقدار حدود نصف بقیه خانواده‌ها باشد. بقیه خانواده‌ها تقریباً به مقدار مساوی وجود دارند. این واقعیت یک نقش خاص و مشخصی را برای هیستون H1 در ساختمان کروماتین مطرح می‌کند [۲۰].

نوکلئوزوم‌ها

برخی از مطالعات در ۱۹۷۰ به حضور یک واحد اساسی برای ساختار کروماتین اشاره دارد. نوکلئازها آنزیم‌هایی هستند که اتصالات فسفودی‌استر را در نوکلئیک اسیدها هیدرولیز می‌کنند. آگزونوکلئازها نوکلئوتیدهای مجزا (منفرد) را از انتهای زنجیره‌های نوکلئیک اسید جدا می‌سازند در صورتی‌که اندونوکلئازها پیوندهای فسفودی‌استر درونی را می‌شکنند. تیمار کردن کروماتین با نوکلئاز میکروکوککی^۱ و نوکلئازی که DNA دو رشته‌ای را می‌شکند، منجر به جداسازی قطعات DNA با اندازه‌های مشخص شده است. این اندازه‌ها تقریباً ضربی از ۲۰۰ bp بودند. مشخص شده است که هر قطعه ۲۰۰ bp با یک مرکز هشت‌تایی^۲ از پروتئین‌های هیستون در تماس است، $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ ، به همین علت است که به آن‌ها هیستون‌های مرکزی گفته می‌شود (قلب نوکلئوزوم)، علاوه بر این قطعه با یک اتصال سست‌تر به یک مولکول H1 نیز متصل است. پروتئین‌ها DNA را از اثر نوکلئاز میکروکوککی حفظ می‌کنند هضم بیشتر قطعه DNA با نوکلئاز منجر به از دست رفتن H1 و ایجاد ساختار پایداری متشکل از ۱۴۶ bp از DNA که به شدت به اکتامر هیستونی متصل است می‌شود. این ساختار به عنوان هسته نوکلئوزوم^۳ شناخته شده است و بدون توجه به منبع کروموزوم از نظر ساختاری خیلی مشابه است.

ساختار بخش هسته نوکلئوزوم با جزئیات زیادی شناخته شده است، این جزئیات از طریق مطالعه ساختار با استفاده از کریستالوگرافی اشعه X به دست آمده‌اند. اکتامر هیستونی یک دیسک گوه‌ای شکل تشکیل می‌دهد که به دور آن ۱۴۶ bp از DNA به طور ۱/۸ دور و در یک مسیر چپ‌گرد قرار دارند. شکل ۱ ساختارهای اساسی و مسیرهای آن‌ها را نشان می‌دهد. چرخش چپ‌گرد DNA به دور نوکلئوزوم مطابق با مسئله ابرمارپیچی منفی و از نوع چرخش‌های ابرمارپیچی^۴ هستند. اگرچه DNA یوکاریوتی در

1 Micrococcal nuclease

2 Octamer core

3 Nucleosome core

4 Superhelical turns

فصل دوم

ریخت‌شناسی

شناسایی چشمی کروموزوم‌ها

چیدمان مورفولوژیکی دسته کامل کروموزومی سلول هرگونه زنده کاریوتایپ نامیده می‌شود. خصوصیات کاریوتایپ هرگونه زنده شامل تعداد کلی کروموزوم‌ها، اندازه و شکل آن‌ها می‌باشد. تعداد دیپلوئید کروموزومی در انسان ۴۶ عدد است. اندازه کروموزوم‌ها ممکن است طول قطعی (به میکرومتر) و یا طول نسبی آن‌ها (به درصد) که عبارت از نسبت اندازه یک کروموزوم به اندازه مجموع طول همه کروموزوم‌های یک دیپلوئید زن است را بیان نماید. اندازه بزرگ‌ترین کروموزوم انسان ۴ تا ۵ برابر کوچک‌ترین آن می‌باشد.

شکل کروموزوم‌ها در لام‌های تهیه‌شده‌ی استاندارد که به‌طور یکسان و همگن رنگ‌آمیزی شده‌اند، با توجه به محل قرار گرفتن سانترومر و نسبت طول بین بازوهای کوتاه^۱ و بلند^۲ آن‌ها تشخیص داده می‌شود که این نسبت تحت عنوان شاخص سانترومری نامیده می‌شود که نسبت طول بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم را نشان می‌دهد. شاخص سانترومری ممکن است در حدود ۵۰٪ (در کروموزوم متاسنتریک)، کمتر از ۵۰٪ (در کروموزوم ساب متاسنتریک) بوده و یا محل سانترومر به انتهای کروموزوم انتقال‌یافته باشد (در کروموزوم آکروسنتریک). کاریوتایپ انسان با سه نوع کروموزوم ذکرشده مشخص و انجام می‌گیرد.

تقسیم‌بندی و نام‌گذاری کروموزوم‌ها در شوراهای بین‌المللی سال ۱۹۶۰ دنور، ۱۹۶۳ لندن و ۱۹۶۶ شیکاگو انجام گردیده است. مطابق تفاهم به‌عمل‌آمده در این شوراها کروموزوم‌ها در هر دسته دیپلوئیدی براساس اندازه‌شان از بزرگ به کوچک چیده می‌شوند. برای چیش کروموزوم‌ها، ابتدا براساس اندازه آن‌ها گروه‌بندی نموده و سپس در داخل هر گروه براساس شکل و شاخص سانترومر که باید از بزرگ به کوچک قرارگرفته باشند، عمل می‌کنند. همه جفت‌های اتوزومی که براین اساس جای گذاری شده‌اند از ۱-۲۲ شماره‌گذاری می‌شوند. کروموزوم‌های جنسی انسان را با حروف لاتین X و Y علامت‌گذاری می‌نمایند و در انتهای کاریوتایپ قرار می‌دهند. براساس مقررات ذکرشده همه اتوزوم‌ها در هفت گروه تقسیم می‌شوند که شکل و اندازه آن‌ها بین گروه‌ها متمایز است و با حروف انگلیسی A تا G نام‌گذاری می‌شوند. چنین گروه‌بندی آسان بوده و از دشواری کاریوتایپ می‌کاهد. این گروه‌ها به شرح زیر دسته‌بندی می‌شوند:

1 P arm
2 Q arm

- ۱- گروه A: شامل سه جفت بزرگ‌ترین کروموزوم‌ها یعنی ۱-۳ که دوتا (۱ و ۳) متاستریک ویکی از آن‌ها (۲) با شاخص سانترومری حدوداً ۴۰٪ یعنی ساب متاستریک می‌باشد.
- ۲- گروه B: شامل دو جفت (۴-۵) کروموزوم‌های ساب متاستریک طولانی است.
- ۳- گروه C: دارای هفت جفت کروموزوم‌های ساب متاستریک (۷-۱۲) با شاخص سانترومری ۳۰-۴۰٪ است که کروموزوم X با این کروموزوم‌ها تفاوتی ندارد.
- ۴- گروه D: در این گروه سه جفت (۱۳-۱۵) کروموزوم‌های آکروستریک قرار می‌گیرند.
- ۵- گروه E: شامل سه جفت (۱۶-۱۸) کروموزوم‌های ساب متاستریک است.
- ۶- گروه F: دارای دو جفت (۱۹-۲۰) کروموزوم‌های کوچک متاستریک می‌باشد.
- ۷- گروه G: دو جفت (۲۱-۲۲) کوچک‌ترین کروموزوم‌های آکروستریک در این گروه قرار می‌گیرند. کروموزوم Y به‌عنوان یک کروموزوم مستقل نام‌گذاری می‌گردد.

در شورای دنور پیشنهاد شده بود که تک‌تک کروموزوم‌ها در هر گروه نشانه‌گذاری گردند که با توجه به تجربیات بعدی مبنی بر شناسایی کروموزوم‌ها براساس اندازه و شکل مشخص شد که فقط چهار جفت اتوزوم‌های ۱، ۲، ۳ و ۱۶ را می‌توان از هم متمایز کرد. در اغلب متافازها به‌شرط رنگ‌آمیزی با کیفیت بالا، اتوزوم‌های ۱۷ و ۱۸ را نیز می‌توان از هم متمایز نمود. امکان شناسایی دقیق تک‌تک کروموزوم‌های شبیه هم از نظر شکل و اندازه با تغییرات چگالی (دانسیته) بین کل کروموزوم‌های هومولوگ هر جفت و چگالی بین بازوهای آن‌ها مرتبط است.

خصوصیات تکمیلی مورفولوژیکی که مهم‌ترین آن‌ها فشردگی و انقباضات ثانویه کروموزوم‌ها^۱ هستند، به شناسایی دقیق‌تر کمک می‌کنند. این‌ها در کروموزوم‌های انسانی به‌استثنای سازمان دهنده‌های هستکی و تشکیل دهنده‌های ساتلیت‌ها، به‌وسیله چگالی ناقص مناطق هتروکروماتین ساختاری شکل می‌گیرند. این مناطق هتروکروماتینی مرتب و منظم در مناطق نزدیک سانترومر روی بازوهای بلند کروموزوم‌های اتوزومی ۱-۹ و ۱۶ دیده می‌شوند که درواقع این باندها در اتوزوم ۹ امکان تشخیص یک یا هردوی این کروموزوم‌ها را در داخل گروه C فراهم می‌آورد. باند هتروکروماتینی اتوزوم ۱ باعث تمایز بازوهای آن می‌شود. باندهای موجود در سایر کروموزوم‌ها به‌صورت نامرتب قابل مشاهده هستند. تفاوت کروموزوم Y که آکروستریک است از سایر کروموزوم‌های آکروستریک گروه G این است که:

- ۱- بازوهای آن بسیار نزدیک هم قرار گرفته‌اند.

1 Secondary chromosomal strangulation

فصل سوم

ریخت‌شناسی رنگ آمیزی افتراقی کروموزوم‌ها

رنگ‌آمیزی‌های افتراقی

پیشنهاد اسامی برای کروموزوم‌های انسانی بعد از آنکه به وسیله رنگ‌آمیزی افتراقی ثابت شد که ساختار خطی آن‌ها مشابه نبوده و ناهمگون می‌باشند، در کنفرانس پاریس در سال ۱۹۷۱ مطرح شده که این سیستم نام‌گذاری را نام‌گذاری پاریسی می‌نامند. چهار روش اصلی برای رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها وجود دارد که G, Q, R و C نام دارند. هر کدام از آن‌ها از نظر فنی چندین موارد اجرایی دارند. سیستم نام‌گذاری سه حرفی انواع رنگ‌آمیزی پیشنهاد شده که شامل روش‌های اصلی رنگ‌آمیزی، تهیه لام‌های کروموزوم و اسم رنگ‌آمیزی (رنگ بکار رفته) می‌باشد. باندها در طول کروموزوم بر اساس رنگ‌آمیزی پیشنهاد شده که G, Q, R و C باند نامیده می‌شوند، آشکار می‌گردند. باید تأکید کرد که هر کدام از رنگ‌آمیزها خطوط متفاوتی در باندهای کروموزوم‌های متافازی آشکار می‌کنند هر چند که این عملکرد در هر کدام از رنگ‌آمیزها کاملاً اختصاصی است. مثلاً در رنگ‌آمیزی C باندینگ فقط باندهای هتروکروماتینی به‌طور مشخص آشکار می‌شوند. علاوه بر رنگ‌آمیزی‌های چهارگانه اشاره شده باید به رنگ‌آمیزی‌هایی که بعداً ابداع شده‌اند و کروموزوم‌های به‌طور مستقل از هم و همچنین باندهایشان را نشان می‌دهند اشاره کرد که آن‌ها را رنگ‌آمیزی‌های انتخابی می‌نامیم. نام‌گذاری پاریسی برای توضیح باندهای کروموزوم‌ها با شکل واحدی اختصاص یافته است. نحوه قرار گرفتن و شماره‌گذاری کروموزوم‌ها در کاریوتیپ همانند سابق باقیمانده و تغییری در روش آن ایجاد نشده است. علامت‌گذاری خطوط باندهای کروموزوم بر اساس اصول زیر می‌باشد (شکل ۱).

۱- هر کروموزوم به‌صورت تجمع قطعات بدون شکاف مشاهده می‌شود که ارتباطی به رنگ‌آمیزی باندها ندارد و بنابراین فاصله‌ای بین این باندها به‌عنوان قطعات بین‌باندی وجود ندارد.

۲- بازوهای بلند کروموزوم‌ها q و بازوهای کوتاه آن‌ها که p نام‌گذاری می‌شوند به مناطقی تقسیم می‌شوند که مرزهای آن‌ها مارکرهای مورفولوژیک^۱ هستند که مرتباً قابل مشاهده می‌باشند. این مناطق به باندها^۲ تقسیم می‌شوند.

باندها عبارت‌اند از بخش‌هایی از کروموزوم‌ها که محل اتصال آن‌ها با شدت رنگ‌آمیزی متمایز می‌شوند (شکل ۶، ۱۰، ۱۳).

۳- مناطق و باندها با اعداد شماره‌گذاری می‌شوند به‌طوری‌که سمت شماره‌گذاری از طرف سانترومر تا انتهای کروموزوم می‌باشد. و به‌طور جداگانه برای هر بازو انجام می‌گیرد بر این اساس هر باند

1 Landmark
2 Bands

اطلاعاتی در مورد کروموزوم، بازو و منطقه‌ای که در آن قرار دارد را می‌دهد. مثلاً 1p22 یعنی باند ۲ در منطقه ۲ بازوی کوتاه اتوزوم ۱. برای نشان دادن ساب باندها از عددهای مربوط آن‌ها با گذاشتن نقطه بعد از عدد باند معین می‌شوند مانند 1q11.2 که در آن عدد ۲ بعد از نقطه نشانگر ساب بند ۲ در باند ۱ و منطقه ۱ بازوی بلند اتوزوم ۱ می‌باشد [۸].

رنگ‌آمیزی Q

رنگ‌آمیزی Q با میکروسکوپ فلورسانسی آشکار می‌شود که در این روش کروموزوم‌ها ممکن است با رنگ متفاوتی دیده شوند اکثر این رنگ‌ها تحت تأثیر نور ماورای بنفش قرار می‌گیرند که به صورت رنگ سبز، گاهی نارنجی و یا حتی قرمز دیده می‌شوند برای تحقیقات کروموزومی معمولاً از لامپ‌های جیوه‌ای مجهز به فیلترهای نوری استفاده می‌شود که این متغیرها شعاع نوری ساطع شده را در دامنه ۳۸۰-۴۸۰ نانومتر و طول موج کوتاه طیف نورتابشی را در محدوده ۴۹۰-۵۴۰ نانومتر محدود می‌کنند. حالت بهینه این دامنه بیشترین طیف نوری و رنگ زمینه‌ای را تأمین می‌کند که به نوع رنگ فلورسانسی و همچنین شرایط تهیه لام بستگی دارد.

از بین رنگ‌های فلورسانسی اکثر رنگ‌های مشتق شده از آکریدین استفاده می‌شوند که عبارت‌اند از: آکریشین^۱ و آکریشین-ایپریت^۲. آکریدین نارنجی در روی لام‌هایی که از قبل آماده نشده‌اند در سراسر طول کروموزوم‌ها طیف یکسانی از رنگ‌های زرد - سبز می‌دهد. درخشندگی رنگ‌های افتراقی آکریشین- از رنگ آکریشین بیشتر و دارای ثبات خوبی هستند.

رنگ‌آمیزی با این رنگ‌های فلورسانسی آسان بوده به‌طوری‌که در موارد متعددی مشخص شده که نتایج رنگ‌آمیزی تفاوتی از همدیگر ندارند. به‌طور کلی نیازی به تهیه کردن لام‌ها از قبل نبوده و قرار دادن آن‌ها در الکل و سپس بافر فسفات به مدت کوتاه کفایت می‌کند. لام‌ها هنگام بررسی با میکروسکوپ باید در درون محلول بافری و یا محلول رنگ‌آمیزی قرار گرفته باشند. آنالیز کوتاه‌مدت لام‌ها زیر میکروسکوپ امکان‌پذیر بوده اما برای آنالیزهای طولانی مدت باید حتماً از روی لام‌ها عکس گرفته شود. وضوح فلورسانس افتراقی کروموزوم‌ها در صفحات مختلف متافازی بسیار متغیر است و در نتیجه متافازهای با وضوح بسیار بالا (شارپ) ندرتاً قابل مشاهده هستند. در این متافازها شدت درخشندگی قطعات مختلف بر اساس نام‌گذاری پاریس در ۵ سطح طبقه‌بندی می‌شود که به شرح زیر می‌باشند.

۱- عدم درخشندگی

۲- درخشندگی کم

1 Acridine

2 Acrichine-yperite

فصل چهارم

تغییرات ریخت‌شناسی کروموزوم‌ها

راه‌های تغییرات موفولوژی کروموزوم‌ها

کروموزوم‌های انسان همانند سایر یوکاریوت‌ها با تغییر ساختار خود متمایز می‌شوند. به‌طور اساسی مطابق تغییرات عملکردی آن‌ها به‌ویژه در ارتباط با تغییرات اساسی حاصل در جریان چرخه میتوز متحمل تغییر و دگرگونی می‌شوند. وضعیت متافازی کروموزوم در شرایط نرمال در طول میتوز به‌صورت کوتاه‌مدت است که با واحد دقیقه قابل‌اندازه‌گیری است. در این مدت کروموزوم‌های اینترفازی وارد فرایند میتوزی می‌شوند، طوری که می‌توان در این حالت چگالی یا تراکم میتوزی بر آن نامگذاری کرد که ساعت‌ها در این حد چگالی خواهند ماند.

مداخله در فرایند متراکم شدن میتوزی ممکن است در طول حیات سلول رخ دهد که در زندگی سلول اثرگذار است. در حالت کلی این تأثیرات به دو نوع تقسیم می‌شوند:

۱- تأثیرات کندکننده

۲- تأثیرات سریع‌کننده

نتیجه اثر اول (کندکنندگی) کشف پدیده تأخیر متراکم شدن بعضی از مناطق در طول کروموزوم می‌باشد. این پدیده ابتدا با تحقیق روی کروموزوم گیاهی با تأثیر سرما و بعد کروموزوم‌های پستانداران با تأثیر کلسمید و بعد آن روی کروموزوم‌های انسانی با تأثیر BrdU (۵-برمو داکسی اوریدین)^۱ به انجام رسید.

ماهیت این پدیده این است که در شرایط معین و مشخص اثر روی سلول در پایان فاز S ممکن است متراکم شدن مناطقی که دیر همانندسازی می‌کنند را به تأخیر بیندازد. تأثیر معکوس روی متراکم شدن در پدیده متراکم شدن زودرس یا نابهنگام کروموزوم‌ها به ظهور می‌پیوندد که این پدیده توسط R.Rao و R.Johnsin (۱۹۷۰ و ۱۹۷۳) مورد مطالعه قرار گرفته است. این پدیده می‌تواند به‌وسیله الحاق دو سلول انجام گیرد به‌طوری که یکی از آن‌ها در متافاز میتوز قرار گرفته و تحت القای متراکم شدن می‌باشد و دیگری ممکن است در مراحل مختلف اینترفاز باشد. در تغییر تجربی و عملی ریخت‌شناسی کروموزومی که در مرحله پایانی بسته‌بندی قرار گرفته و درواقع بسته‌بندی مواد کروموزومی به انتها رسیده واقعیت جالبی در زمینه سازمان ساختاری کروموزوم‌ها در دوره میتوز حاصل شده است. تأثیرات

¹ 5-bromodeoxyuridine

ذکرشده در مراحل مختلف برداشت کروموزوم‌ها بعد از کشت (افزودن محلول هیپوتونیک و فیکساتور) و یا تهیه لام‌ها و حتی لام‌های آماده‌شده قابل اجرا می‌باشند [۵ و ۹].

تراکم تأخیری کروموزوم

در همه منابع در مورد تأخیر در متراکم شدن کروموزوم انسانی در بعضی مناطق از طول آن‌ها در اثر سرمادهی و تأثیر ویروس‌ها اطلاعاتی داده‌شده است؛ اما امکان تقلید و تکرار این پدیده به‌طور سیستماتیک و درروی همه کروموزوم‌های انسانی از طریق به‌کارگیری مواد شیمیایی میسر می‌گردد که از بین آن‌ها BrdU بیشترین کاربرد را دارد. بررسی سیستماتیک این موضوع روشی را پیش پا گذاشت که به‌وسیله آن می‌توان تراکم تمیزی کروموزوم‌ها را در طول همه آن‌ها معین نموده و بدین ترتیب هر کروموزوم را بر اساس تصویر اختصاصی تراکم افتراقی آن شناسایی نمود. با پیشرفت این روش‌ها بررسی زمان همانندسازی DNA در کروموزوم‌ها امکان‌پذیر شد. برای شناسایی کروموزوم‌ها براساس تراکم افتراقی آن‌ها، BrdU را با دوز بالا در آخرین ساعت‌های فاز S به محیط کشت اضافه می‌کنند با توجه به فعالیت تهاجمی دوز بالای آنالوگ تیمیدین (BrdU) روی حرکت سلول‌ها در چرخه میتوز باعث محصورشدن سنتز داخلی سیتوزین قبلی می‌گردد که توصیه می‌شود همراه با داکسی سیتیدین اضافه گردد.

ریخت‌شناسی تراکم نامساوی کروموزوم متأثر از BrdU می‌تواند با رنگ‌های گیمسا و دیگر رنگ‌های عمومی و یا با رنگ آکریدین نارنجی تحت میکروسکوپ فلورسانس مورد مطالعه قرار گیرد. باید خاطرنشان کرد که در مقایسه با شکل کروموزوم با رنگ‌آمیزی افتراقی G و R و Q، ریخت‌شناسی کروموزوم شامل آنالوگ تیمیدین ممکن است در یک مرحله‌ی یکسان از متافاز از نظر تراکم، متفاوت با آنالوگ خود باشد. چون موفولوژی با مقدار DNA موجود اولیه معین و مشخص می‌گردد، مقدار DNA در سلول‌های مختلف در زمان‌های متفاوت از چرخه میتوز کاملاً متفاوت است. این تفاوت بین متافازها در مراحل پراکنده شدن به‌ویژه در لام‌های رنگ‌آمیزی شده با آזור قابل مشاهده است. حتی در متافازهای بهینه‌شده از نظر مراحل متراکم و پراکنده شدن کروموزوم‌ها، همه کروموزوم‌ها به‌طور یکسان تحت تأثیر قرار می‌گیرند. نواریندی اتوزوم‌های ۱، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و کروموزوم‌های جنسی X و Y دقیق و منظم می‌باشند. در طول این کروموزوم‌ها دریک یا بیشتر نقاط، مناطق غیر متراکم نسبتاً زیادی وجود دارد که در نتیجه آن‌ها هر کروموزوم دارای شکل موفولوژیکی اختصاصی می‌باشد. مقایسه همانندسازی ساختاری این کروموزوم‌ها نشان داد که باندهای غیرمتراکم در مناطقی از همانندسازی وجود دارند که بسیار دیر و در واقع در انتهای همانندسازی ساخته می‌شوند. در لام‌های با کیفیت بالا همیشه می‌توان متافازهایی را یافت که در آن‌ها هر جفت کروموزوم می‌تواند بدون نیاز به مقایسه طول آن‌ها و شاخص سانترومری‌شان شناسایی شود. حتی در واکنش‌های ضعیف BrdU در سلول‌های نرمال

فصل پنجم
تکثیر کروموزوم‌ها

اصول مطالعه تکثیر کروموزوم‌ها

تکثیر کروموزوم‌ها عبارت است از تولید مجدد دسته کامل آن‌ها به وسیله سلول در هر چرخه تقسیم سلولی با حفظ کامل ویژگی‌های هر کدام از آن‌ها که در نتیجه آن وراثت ژنتیکی سلول‌ها و موجودات زنده در نسل‌های بعدی حفظ می‌شود. فرایند تکثیر در سطح مولکولی به وقوع می‌پیوندد و به دو جزء اصلی مولکولی کروموزوم وابسته است که عبارت‌اند از DNA و هیستون‌ها. با وجود این، اهمیت قانونمندی آن تأثیر تکثیر کروموزوم‌ها را به عنوان ساختارهای سلولی می‌توان با استفاده از روش‌های مطالعه سیتولوژیکی نحوه توزیع DNA و پروتئین‌های اولیه بین کروموزوم‌ها درک کرد. قانونمندی اصلی تکثیر کروموزوم از طریق مطالعه همانندسازی DNA ساختار دو رشته‌ای مولکول DNA را تأمین می‌کند. هر دو رشته مکمل از هم جدا شده و سنتز رشته مکمل جدید از روی آن‌ها را فراهم می‌سازند. به این ترتیب همانندسازی DNA نیمه حفاظت شده شناخته می‌شود. در واقع بعد از همانندسازی هر دو مولکول DNA دختری دارای یک نسخه از مولکول‌های پلی نوکلئوتیدی قبلی و تازه سنتز شده می‌باشند.

مطالعه تکثیر کروموزوم‌ها در سطح سیتولوژیک به کمک دو روش به اجرا درمی‌آید. روش اول که با استفاده از نوعی رادیوایزوتوپ انجام می‌گرفت و به وسیله رادیواتوگراف تشخیص نهایی در خصوص DNA اولیه و DNAهای سنتز شده داده می‌شد که در اواخر سال ۱۹۵۰ ابداع گردیده و تا اوایل سال ۱۹۷۰ تنها روش بررسی و مطالعه در این زمینه محسوب می‌گردید. از اوایل ۱۹۷۰ که تقریباً از آن زمان به طور ثابت قابل استفاده بوده عبارت از روشی است که با بکار بردن ^3H -BrdU انجام می‌گرفت که در آن از آنالوگ تیمیدین به عنوان DNA اولیه استفاده می‌گردد. در این روش DNA اولیه را با BrdU و تیمار می‌کنند و سپس با توجه به تغییرات رنگ آمیزی مناطقی که BrdU را جذب کرده‌اند، به شناسایی و تعیین مناطق مورد نظر در تکثیر کروموزوم می‌پردازند. همانطوری که مشخص است تکثیر کروموزوم در مرحله S اینترفاز سلولی انجام می‌گیرد که در مورد اصول و مقررات آن می‌توان با تحقیق روی کروموزوم‌های متافازی پس از اتمام تکثیر بررسی و قضاوت نمود. به همین دلیل DNA الگوی نشان‌دار شده باید در اختیار سلول قرار گیرد (البته سلولی که در فاز S قرار گرفته است) برای این منظور

از سلول‌هایی استفاده می‌شود که از نظر تقسیم و تکثیر سلولی در محیط کشت سلولی بسیار فعال بوده که اغلب از لنفوسیت‌های خون و فیروبلست‌های پوست یا بافت جنینی استفاده می‌نمایند. برای بررسی ویژگی‌ها و نحوه تقسیم DNA الگو و سنتز شده در بین سلول‌های تقسیم‌شده آن را نشان‌دار می‌نمایند و در همه فازهای چرخه تقسیم مورد ارزیابی قرار می‌دهند و آنالیز آن در متافاز دوم و تقسیم بعدی انجام می‌گیرد. مشکل مهم دیگری که مطرح است عبارت از استمرار همانندسازی DNA در دسته کروموزومی یا تک‌تک کروموزوم‌ها است که برای مطالعه آن نیاز به نشان‌دار کردن سلول‌ها در زمان‌های معینی از فاز S چرخه سلولی دارد. مطلوب‌ترین حالت این است که نشان‌دار کردن بهتر است به صورت طولانی انجام گیرد یعنی اینکه به مدت چند ساعت (از اواخر S تا پایان فاز G2) بدون اینکه تا زمان فیکس کردن سلول‌ها خارج نمایند. اصول یاد شده در خصوص طرز استفاده از DNA الگو در مطالعه تکثیر کروموزوم‌ها برای روش BrdU و نشان‌دار کردن با رادیوایزوتوپ‌ها یکسان می‌باشد (شکل ۵-۱۲) [۴ و ۵].

DNAهای الگوی نشان‌دار شده با رادیواکتیو

برای نشان‌دار کردن DNA الگو از ذرات بتا و ایزوتوپ تریتیوم (^3H) استفاده کرده و با کمک رادیواتوگراف کروموزوم‌ها را ردیابی و شناسایی می‌نمایند. برای این منظور معمولاً از تیمیدین نشان‌دار (^3H -dt) استفاده می‌شود چون این نوکلئوزید بسیار اختصاصی برای DNA می‌باشد. همچنین می‌توان از آنالوگ تیمیدین حاوی BrdU و داکسی سیتیدین^۱ استفاده نمود. داکسی سیتیدین نه تنها به تیمین بلکه به سیتوزین DNA داخل می‌شود.

آنالیز توزیع نشانگر رادیواکتیو روی کروموزوم‌ها به صورت کیفی و کمی انجام می‌گیرد که مسائل مورد طرح در تحقیق را بیان و روشن می‌کند. در این آنالیز معمولاً متافازهای (کروموزوم‌های) نشان‌دار شده با نشان‌دار نشده مورد تطبیق و مقایسه قرار می‌گیرند. ارزیابی کمی توزیع و پخش نشانگر یا برچسب رادیواکتیو با شمارش ذرات نقره به کمک روش‌های مختلف مطالعه کمی اطلاعات حاصله انجام می‌گیرد. امکان ارزیابی و سنجش کمی با توجه به اینکه یک ارزیابی نسبی می‌باشد ترجیحاً با استفاده از رادیواتوگراف در مطالعه همانندسازی DNA در سطح کروموزومی انجام می‌گیرد. از معایب این متد این است که برای مطالعه استمرار همانندسازی DNA در کروموزوم نتایج ضعیفی را نشان می‌دهد.

باید خاطر نشان کرد که روش رادیواتوگرافی با میکروسکوپ نوری برای مطالعه همانندسازی DNA در سطح مولکولی قابل استفاده است. در این موارد با کمک عامل لیتیومی DNA (Li) دارای تیمیدین

¹ Deoxycytidine

فصل ششم

انحرافات کروموزومی

طبقه‌بندی عمومی

به‌طور ذاتی یا اکتسابی در سلول‌های زاینده و سوماتیک انسان انحرافات در ارتباط با تغییرات عددی یا ساختاری کروموزوم‌ها می‌توانند به وجود آیند. انحرافات کروموزومی موجود در سلول‌های زاینده (تولیدمثلی) موجب آسیب‌های جنینی (مادرزادی) متفاوتی در انسان می‌شود. این انحرافات در ارتباط با جهش‌های ژنومی (در موارد تغییر عددی کروموزوم) یا کروموزومی (در انحرافات ساختمانی) می‌باشد. انحرافات ساختمانی یا همان جهش‌های کروموزومی نقش مهمی در تکامل ژنوتیپ ایفاء نموده و یکی از مکانیسم‌های پیش ترکیبی ژنی همانند داخل کروموزومی و بین کروموزوم‌های غیرهمولوگ می‌باشد.

وجود انحرافات کروموزومی در سلول‌های سوماتیک اهمیتی در تکامل نداشته و موجب تغییرات پاتولوژیکی آشکار در موجود زنده نمی‌شود هرچند که گاهی در ارتباط با آن‌ها مواردی مشاهده می‌شود؛ اما این اصل وجود دارد که تجمع انحرافات کروموزومی در سلول‌های سوماتیک یکی از عوامل گسترش تومورهای بدخیم سلول‌ها و همچنین فرایند پیری موجود زنده است.

انحرافات کروموزومی در سلول‌های سوماتیک تحت تأثیر فاکتورهای مختلف محیطی با آن‌هایی که به‌طور مداوم روبرو هستیم به وجود می‌آید. در شرایط آزمایشگاهی آن‌ها می‌توانند با عوامل مختلفی در کشت‌های سلول‌ها موجب تأثیر بشوند. همه این‌ها زمینه مکانیسم‌های تغییرات همه‌جانبه و عمیق و دلایل وجود انحرافات کروموزومی در انسان را از یک طرف فراهم نموده و از طرف دیگر روش‌های عملی متفاوت بیولوژیکی القاء‌کننده فعالیت موتاژنی روی انسان ناشی از عوامل محیط اطراف می‌شود.

ناهنجاری‌های کروموزومی ممکن است عددی و یا ساختمانی باشند و ممکن است یک یا چند اتوزوم، کروموزوم جنسی و یا هردو را به‌طور هم‌زمان درگیر کنند. در این فصل انحرافات ساختاری کروموزوم‌ها (تغییر ساختمان کروموزوم‌ها)، اعم از مادرزادی و یا در نتیجه القائات مختلف مشاهده‌شده در سلول‌های سوماتیک انسان و همچنین انحرافات عددی موردبحث قرار می‌گیرند که در منابع علمی اکثراً تحت عنوان Chromosome aberrations و chromosome abnormalities موردبحث قرار گرفته‌اند.

ناهنجاری‌ها یا انحرافات کروموزومی با استفاده از یک سری اختصارات و اصطلاحات توصیف‌شده‌اند که در نمودار ۱ ارائه‌شده است [۵ و ۱۲].

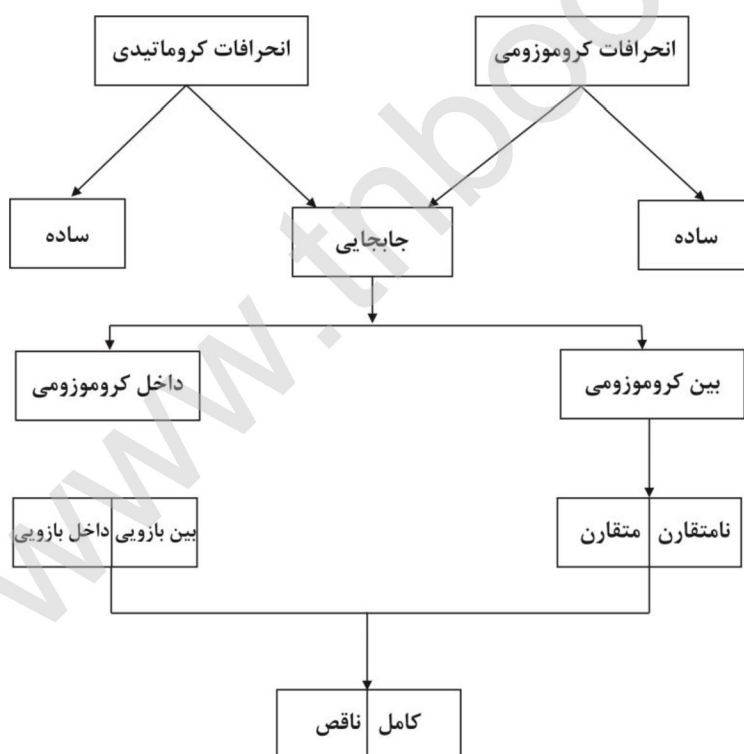
انحرافات یا نوترتیبی‌های ساختاری (structural aberration یا structural rearrangements)

تفاوت مورفولوژیکی اساسی بین کروموزوم‌های تغییر یافته موجود در انواع مختلف سلول‌ها (سوماتیک و جنسی) وجود ندارد به شرط آنکه در متافاز تقسیم سلولی تثبیت گردد.

همه انحرافات ساختاری کروموزومی موجود در سلول‌های سوماتیک انسان در مرحله‌ی متافازی تثبیت شده و به دودسته‌ی اصلی تقسیم می‌شوند:

۱- انحرافات نوع کروموزومی

۲- انحرافات نوع کروماتیدی (نقشه‌ی زیر)



نمودار ۱: طبقه‌بندی عمومی انحرافات کروموزومی

فصل هشتم

هیبریداسیون فلورسانس در جا (FISH)

یکی از پیشرفت‌های قابل توجه در سیتوژنتیک پزشکی هیبریداسیون فلورسانس درجا^۱ (FISH) می‌باشد. زمانی که فن‌آوری پایه‌ای درجا بیش از ۳۰ سال قبل گسترش یافت، تکنیک تشخیص فلورسانسی دوره‌سازی DNA پروب با توالی‌های هدف کروموزومی در اواخر دهه ۱۹۸۰ به آزمایشگاه‌های سیتوژنتیک بالینی معرفی گردید. فرآیند کلی دوره‌سازی همانند به‌کارگیری پروب‌های رادیواکتیو است، اما مزیت اصلی آن استفاده از پروب‌های فلورسانسی است که دارای حساسیت بسیار بالا برای آزمایشات سریع و ساده می‌باشد که در سال‌های اخیر تحت عنوان سیتوژنتیک مولکولی نامیده شده و بخش جدایی‌ناپذیر آزمایشگاه سیتوژنتیک بالینی گردیده است به‌طوری‌که به‌عنوان یک استاندارد برای مطالعه انحرافات کروموزومی پذیرفته شده است. تکنیک FISH امکان مطالعه انحرافات ژنتیکی‌ای که برای مشاهده با روش‌های معمولی سیتوژنتیکی بسیار کوچک هستند را با استفاده از توالی‌های استاندارد DNA فراهم می‌سازد. علاوه بر این، با توجه به پیچیدگی تغییرات تعداد نسخه در ژنوم انسانی، FISH یک ابزار مهم برای مشاهده تغییرات تعداد نسخه، تعیین علت تغییر و همبستگی اهمیت بالینی آن است.

روش‌شناسی

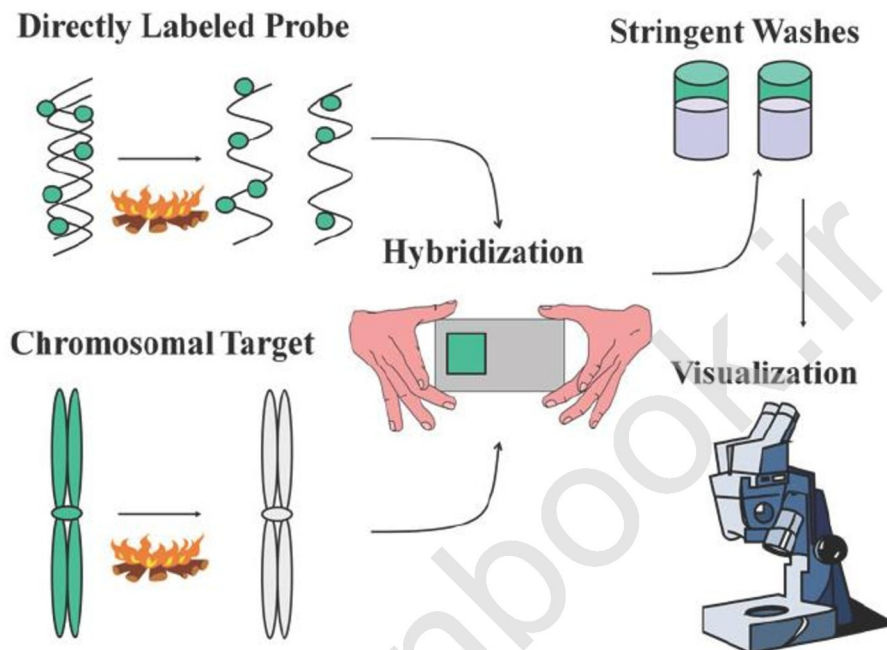
روش FISH که به‌طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد، شامل دوره‌سازی پروب نشاندار DNA با هدف کروموزومی در (روی اسلاید با لام) می‌باشد. DNA‌های پروب و هدف به وسیله گرمادهی با دمای بالا در محلول نمکی فراماید واسرشت می‌شوند. پروب به مقدار بسیار زیادی روی کروموزوم‌ها ریخته می‌شود تا به‌طور مطمئن به هدف اختصاصی متصل شود. پروب از طریق نور فرابنفش ساطع شده از یک فلوروکروم مانند «فلورسین-۵- تیوسیانات»^۲ (FITC) یا رودامین^۳ تشخیص داده می‌شود که به‌طور مستقیم به DNA پروب چسبیده شده یا به وسیله گرمادهی یک پروب نشاندار شده با بیوتین یا دیگوسیژنین^۴ با مزدوج فلورسنتی حاصل می‌شود (شکل ۱). الگوهای سیگنال FISH می‌تواند به‌طور دستی به‌وسیله یک تکنسین واجد شرایط و خبره به دست آید و یا با استفاده از تکنیک کامپیوتری مورد آنالیز قرار گیرد [۱۰].

1 Fluorescent in situ hybridization

2 Fluorescein- 5- thiocyanate

3 Rhodamin

4 Digoxigenin



شکل ۱: نمایش شماتیک مراحل اصلی روش FISH. هر دوی پروب و هدف کروموزومی به وسیله دمای بالا واسرشت می‌شوند. توالی‌های پروب با توالی‌ها مکمل هدف دورگه می‌شوند و اتصال غیراختصاصی از طریق شستشوی سخت و دقیق حذف می‌شوند. دورگه شدن پروب به وسیله میکروسکوپ فلورسانس تشخیص داده می‌شود [۱۰].

انواع پروب

توالی قابل دسترس حاصل از پروژه ژنوم انسان موجب تولید پروب‌های ویژه تکنیک FISH برای همه کروموزوم‌های انسانی شده است به‌طوری‌که اکثر پروب‌های مورد استفاده برای اهداف بالینی به‌صورت تجاری به فروش می‌رسند. اغلب، پروب‌ها در سه گروه کلی دسته‌بندی می‌شوند که عبارت‌اند:

الف) پروب‌های توالی تکراری

ب) پروب‌های توالی منحصربه‌فرد

ج) پروب‌های کل کروموزوم