

medicus



ISSN 1857-5994

ИНФОРМАТИВЕН ГЛАСНИК НА ЈАВНОТО ЗДРАВСТВО - ШТИП, Година 12, Број 32, Март 2022

СКРИНИНГ НА СЛУХ КАЈ НОВОРОДЕНИ

**ГРАНИЧНО РАСТРОЈСТВО НА ЛИЧНОСТА И
БИПОЛАРНО АФЕКТИВНО РАСТРОЈСТВО**

ГЕРСТМАНОВ СИНДРОМ

**ВЕЗИКОУРЕТРАЛЕН РЕФЛУКС КАКО ЕДНА ОД
НАЈЧЕСТИТЕ АНОМАЛИИ КАЈ ДЕЦАТА**

Автор: Азра Дрпљанин

Коавтор: Невенка Величкова

ЈЗУ Универзитетски институт за клиничка биохемија - Скопје, Факултет за медицински науки, Универзитет "Гоце Делчев" - Штип

ПРИМЕНА И МОЖНОСТИ НА FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION) МЕТОДАТА ВО ЦИТОГЕНЕТСКИ ИСТРАЖУВАЊА

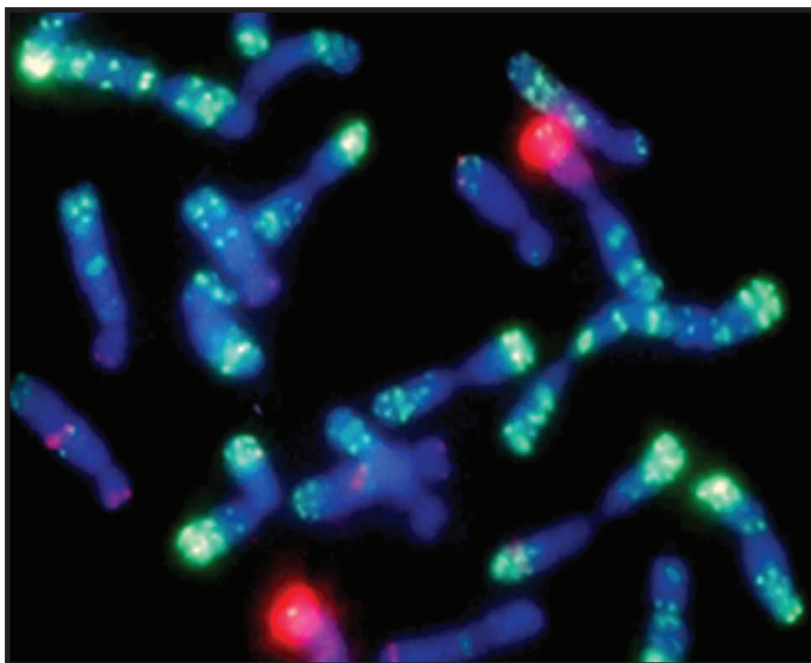
FISH (Fluorescence in situ hybridization) методата е спој на конвенционална цитогенетика и молекуларната биологија, истата се базира на хибридизација на одредена генска секвенца од испитуваниот хромозом и соодветна нуклеотидна низа одбележана со флуоресцентен маркер (проба). Методата се користи за локализација и скрининг на одреден ген во геномот, детекција на различни мутации или детекција на експресијата на одредени гени. Во текот на последната деценија FISH методата се почесто се користи како стандардна и истражувачка метода особено во делот на цитогенетиката. Се работи за високо специфична метода со која се потврдуваат хромозомски аберации во интерфазно јадро на различни клеточни линии (широк спектар на клеточни култури, свежи и замрзнати примероци, цитолошки материјал за анализа, ткива фиксирани во формалин и вклопени во парафин).

Протоколот на оваа метода се состои од два чекори. Во првиот се врши денатурација на протеините со висока температура (над 95°C)

со што доаѓа до развојување на двоверижниот ланец на ДНК на анализираните хромозоми како резултат на кинење на водородните врски помеѓу комплементарните нуклеотиди. Во вториот чекор, вака развоените вериги на температура од 65°C имаат способност повторно да се поврзат помеѓу себе и да формираат двоверижна молекула. Токму ваквиот процес при кој настанува поврзување на двете комплементарни вериги при што се формира двоверижна структура се нарекува хибридизација. Хибридизација може да се одвива помеѓу сите типови на нуклеински киселини, ДНК со ДНК, ДНК со РНК или РНК со РНК. Единечната ДНК молекула, која се користи за детектирање на комплементарната секвенција, се нарекува хибридизациона проба или накратко проба. Оваа секвенција може да биде долга од неколку десетици до неколку илјади нуклеотиди. За визуализација на хибридизацијата, пробата се поврзува со некој маркер, односно во пробата се инкорпорираат претходно маркирани нуклеотиди. Како маркер се користат радиоактивни изотопи, флуоресцентни молекули или

The diagram illustrates the FISH process in several stages. On the top left, a 'probe DNA' is shown being 'Labeling with fluorescent dye'. This is followed by 'Denature & Hybridize' steps, showing the probe binding to a target DNA structure. On the top right, a photograph shows a microscope with a computer monitor displaying a cell with fluorescently labeled chromosomes. On the bottom left, a schematic shows 'denaturation' of DNA strands followed by hybridization with a probe marked with stars. On the bottom right, a fluorescence micrograph shows a cell with blue-stained chromosomes and red fluorescent spots.

Fluorescent InSitu Hybridization [FISH]



ензимски компоненти. Хибридизацијата е многу специфичен и сензитивен процес во кој со соодветена проба може да се препознае единечна секвенца во целиот геном. Терминот “in situ” значи “на вообичаено место” т.е хибридазијата се одвива во внатрешноста на клетките каде вообичаено се наоѓа целната ДНК или РНК.

Доколку секвенцата која ја изучуваме не ни е доволно позната и немаме соодветна идентична проба за нејзина детекција, специфичноста на хибридизацијата може да се намали со тоа што се изведува на пониска температура. Колку поголемо е температурното отстапување од 65°C, толку е помала и специфичноста на методата. Резултатите се анализираат со флуоросцентен микроскоп со помош на соодветни филтри.

Постојат неколку видови на FISH методи кои се разликуваат по бројот на анализираните генетски секвенци и бројот на проби кои се користат (центромер специфични проби, анализа на целиот хромозом- whole chromosome painting probes, локус специфични проби, спектрелни или SKY, мултиколорни). Доколку се користи една проба се одбележуваат генетските секвенци со една флуоросцентна боја (со што во нормални клетки се отчитуваат два сигнали).

Според начинот на врзување на флуоросцентниот маркер, FISH методата може да биде директна и индиректна. Во директната метода самата проба е врзана за флуорохром, додека кај индиректната нуклеотидните проби најнапред се врзуваат со биотин или дигоксигенин потоа се визуелизираат со помош на антитела на биотин или дигоксигенин врзан за флуорохром.

Многу често некои хромозомски аберации (пр.балансираните транслокации, минорни делеции или реанжмани во хромозомскиот материјал) не можат да се детектираат со стандардна цитогенетска анализа од таа причина со FISH методата се овозможува детекција и на најмалите промени во хромозомскиот материјал кои настанале од различни причини или изложеност на организмот. Особена предност на оваа метода е што можат да се детектираат промени во интерфазно јадро, да се користат различни клеточни линии и анализата трае многу кратко време (24-48ч). Од таа причина оваа молекуларна метода денес се смета за златен стандард за одредување на бројот на копии на одреден ген, имајќи во пред-

вид дека денешните комерцијални FISH китови (dual color) обично имаат специфична проба за одреден ген и контролна центромерна проба обележана со различни флуорохроми.

Со унапредување на техничко-технолошките можности, подобрување на хибридизационите протоколи, достапноста на проби и флуорохром, потребата од мултиколорни анализи, значењето и примената на FISH методата посебно во рамките на цитогенетиката е се поголемо. FISH методата како молекуларна метода е широко апликативна во медицината ако се земе во предвид дека раната молекуларна дијагностика е од клучна важност за понатамошниот третман и терапија посебно кога станува збор за заболувања со непозната или комплексна етиологија.

References:

- Bosnjakovski, D. Molekularna biologija so genetika, 2017, UGD, Stip
- Bouchalová, K., Trojanec, R., Kolár, Z., Cwiertka, K., Cernáková, I., Mihál, V., Hajdúch, M. (2006) Analysis of ERBB2 and TOP2A gene status using fluorescence in situ hybridization versus immunohistochemistry in localized breast cancer. *Neoplasma*, 53(5): 393-40
- Brown, L.A., Huntsman, D. (2007) Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: Challenges and solutions. *J Mol Histol*, May;38(2):151-7
- Shin, S.J., Chen, B., Hyjek, E., Vazquez, M. (2007) Immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in HER-2/neu status in cell block preparations. *Acta Cytol*, Jul-Aug, 51, (4), 552-7 и др.