



К.С. Задесенец*, Т.В. Карамышева*,
А.Г. Богомолов*, А.В. Катохин*,
В.А. Мордвинов*, Н.Б. Рубцов*

Хромосомы описторхид

Описторхиды (сем. Opisthorchiidae) являются паразитами, имеющими сложный жизненный цикл, включающий несколько хозяев. Наиболее распространенными представителями являются *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, образующие «описторхозную триаду». Инфицирование данными видами описторхид вызывает схожие патофизиологические процессы в печени и желчном пузыре дефинитивных хозяев.

В ходе исследований, посвященных детальному изучению описторхид, в ИЦиГ СО РАН начаты работы по молекулярно-цитогенетическому анализу их хромосом:

- Отработаны протоколы получения митотических и мейотических хромосом описторхид и методы их дифференциального окрашивания.
- Проведен анализ размеров и локализации в хромосомах описторхид блоков конститутивного гетерохроматина.
- У исследованных видов определена локализация кластеров рибосомных генов и активных ядрышкообразующих районов.
- Описаны паттерны распределения кластеров теломерных повторов.
- Получены микродиссекционные ДНК-библиотеки крупных хромосом *O. felineus* и *M. xanthosomus*.
- Разработаны методы хромосомного пэинтинга микродиссекционных ДНК-проб с хромосомами описторхид.
- Проведен сравнительный анализ кариотипов 5 видов описторхид.

В результате проведения микроскопических исследований, включающих трехмерную лазерную сканирующую микроскопию и традиционные гистологические методы окрашивания, в составе мариты (половозрелой особи) описторха определены органы, содержащие значительное число делящихся клеток, что обеспечило получение качественных препаратов митотических и мейотических хромосом (рис. 1).

Описаны кариотипы *O. felineus*, *Metorchis xanthosomus*, *O. viverrini*, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis*. Кариотип этих паразитов (кроме *O. viverrini*) представлен 7 парами хромосом, 2 из которых – крупные мета- или субметацен-

трические, а остальные 5 – мелкие субмета-, мета- и акроцентрические хромосомы. У *O. viverrini* диплоидный набор хромосом представлен 6 парами хромосом (две – крупные мета- и субметацентрические, остальные – мелкие субмета-, мета- и акроцентрические хромосомы).

Показано, что С-блоки локализованы в прицентромерных районах хромосом. В связи с их небольшим размером они были четко описаны только при микроскопии пахитенных хромосом (рис. 2). Проведенное AgNOR-окрашивание позволило выявить крупные ядрышкообразующие районы (ЯОР) в ядрах (1 или 2) и на слабоконденсированных хромосомах (рис. 3). Для более точной локализации ЯОР была проведена FISH 18S рДНК с хромосомами всех 5 видов описторхид (рис. 4). Флуоресцентный сигнал был локализован в прицентромерном районе р-плеча хромосомы 3 у всех исследуемых видов описторхид.

Для анализа распределения теломерной ДНК в геноме паразитов была проведена FISH теломерной ДНК-пробы (TTAGGG)_n с хромосомами описторхид. В результате сигналы были локализованы на концах плеч хромосом описторхид, при этом не было выявлено интерстициальных кластеров теломерных повторов (рис. 5). Они не были обнаружены даже у виверровой двуустки, кариотип которой представлен 6 парами хромосом, что предполагает относительно недавнее слияние предковых хромосом и возможность сохранения в районе слияния теломерных повторов. Для выявления небольших кластеров теломерной ДНК была проведена FISH теломерной PNA-пробы с хромосомами всех видов описторхид, но и она не выявила интерстициальных кластеров в хромосомах описторхид (рис. 6).

Для проведения сравнительного анализа с помощью микродиссекции были созданы ДНК-пробы, специфичные хромосомам 1 и 2 *O. felineus* и *M. xanthosomus*. FISH полученных ДНК-проб с хромосомами *O. felineus* и *M. xanthosomus* соответственно показали наличие хромосомоспецифичных кластеров повторенных последовательностей, локализованных в прицентромерных районах хромосом 1 и 2 (рис. 7). Кроме того, распределение сигналов FISH этих

ДНК-проб показало наличие диспергированных повторов в геноме описторха и меторха.

Разработанный метод компьютерной обработки результатов гибридизации микродиссекционных ДНК-проб,

проводимой без супрессии гибридизации повторенных последовательностей, позволил добиться специфического окрашивания материала соответствующих хромосом.

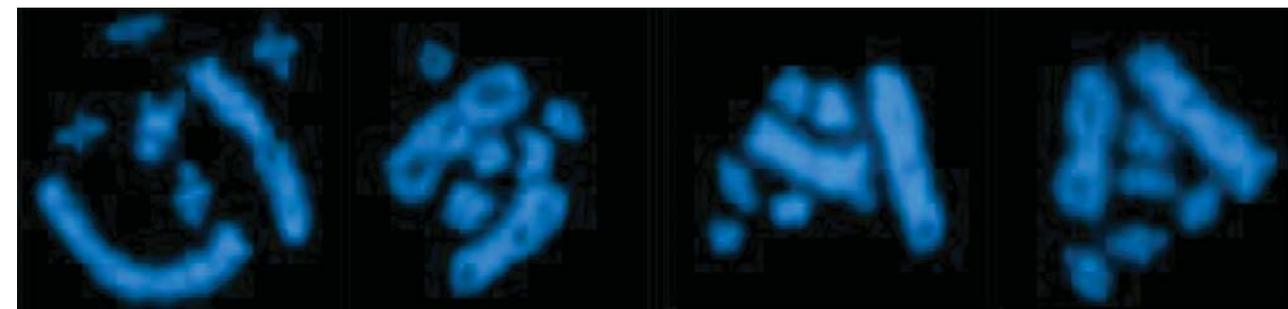


Рис. 1. Мейотические хромосомы *O. felineus*. Общая окраска хромосом DAPI.

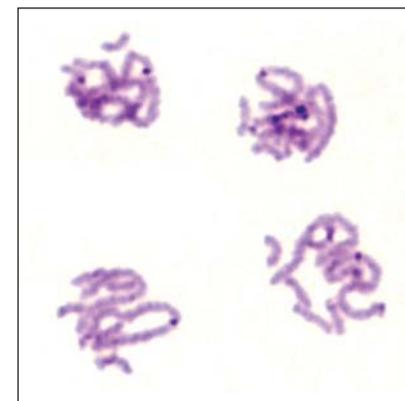


Рис. 2. С-дифференциальное окрашивание хромосом *O. felineus* (пахитена).

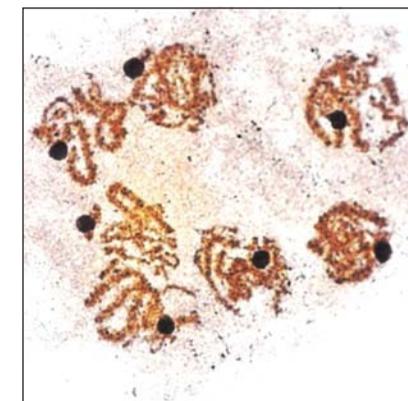


Рис. 3. AgNOR-окрашивание хромосом *O. felineus*.

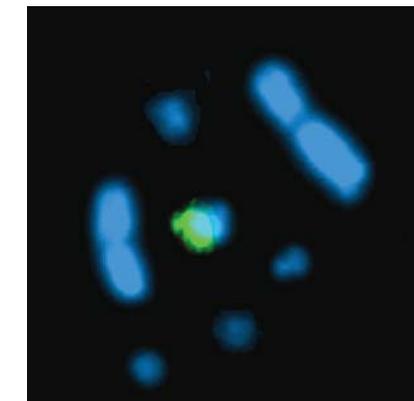


Рис. 4. FISH 18S рДНК с хромосомами *M. xanthosomus*. Зеленый сигнал – кластер рДНК, синий – общая окраска хромосом DAPI.

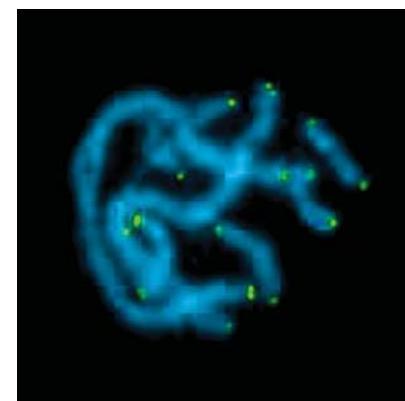


Рис. 5. FISH (TTAGGG)_n с хромосомами *C. sinensis*. Зеленый сигнал – теломерная ДНК, синий – общая окраска хромосом DAPI.

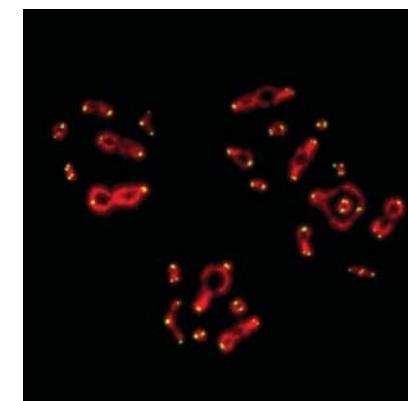


Рис. 6. FISH теломерной PNA-пробы с хромосомами *O. viverrini*. Желтый сигнал – теломерная ДНК, красный – общая окраска хромосом DAPI.

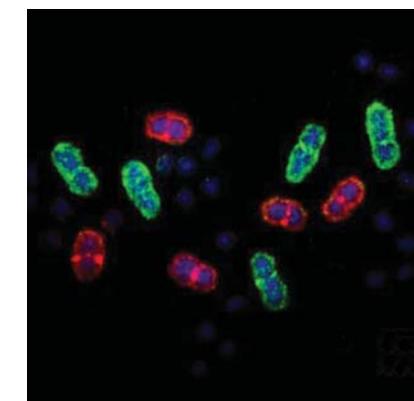


Рис. 7. FISH хромосомоспецифичных ДНК-проб 1 и 2 с хромосомами *O. felineus*. Зеленый сигнал – хромосома 1, красный – хромосома 2, синий – общая окраска хромосом DAPI.