

Яковлева Дарья Васильевна

лаборант-исследователь, бакалавр

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологииФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»***Зимнуров Айдар Раилевич***

лаборант-исследователь, бакалавр

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологииФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»***Анашкина Юлия Анатольевна***

лаборант-исследователь, магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»***Фирсова Наталья Викторовна***

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологииФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»***Фирсов Константин Николаевич***

магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»***Антонова Елена Ивановна***

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-139064

FISH-ТЕХНОЛОГИИ В ОБЛАСТИ КЛИНИЧЕСКИХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

***Аннотация:** статье рассматриваются методы технологии FISH (флуоресцентной in situ гибридизации), их модификации, применение в клинической диагностике и фундаментальных исследованиях.*

***Ключевые слова:** FISH, молекулярная цитогенетика, ДНК-зонд, хромосома, абберрации, флуорохром, генетическая диагностика, ген, гибридизация, ДНК-последовательность.*

Внедрение флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) более 40 лет назад ознаменовало начало новой эры в изучении структуры и функции хромосом. Эволюция технологии FISH привела к появлению множества модификаций метода, благодаря повышению чувствительности, специфичности, разрешающей способности, развитию флуоресцентной микроскопии, цифровой визуализации, а также расширению геномных и биоинформационных ресурсов. Технологии FISH значительно продвинули как диагностику, так и исследования солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований. Благодаря своей универсальности и высокой точности метод FISH нашел широкое применение в различных областях биомедицинских исследований – в нейробиологии для изучения организации хромосом, в репродуктивной медицине – для преимплантационной генетической диагностики, в области токсикологических исследований, экологии микроорганизмов, эволюционной и сравнительной геномике, а также в фундаментальных исследованиях структуры и функции хромосом [2; 5; 15; 17; 29; 32].

Современная онкогенетика базируется на выявлении ключевых геномных аббераций [12; 19; 31]. Методы FISH, NGS (Next-Generation Sequencing) и CGH

(Comparative Genomic Hybridization) позволяют проводить точное молекулярное профилирование, определяя терапевтические мишени, такие как HER2, ALK, ROS1. Интеграция цитогенетических и молекулярных данных обеспечивает персонализированный подход в онкологии, улучшая стратификацию пациентов и прогноз заболевания [3; 12].

FISH-метод молекулярной цитогенетики, основан на использовании флуоресцентных ДНК-зондов для детекции специфических хромосомных аномалий в интерфазных и метафазных ядрах. Метод не требует культивирования клеток и позволяет быстро выявлять клинически значимые генетические нарушения, включая транслокацию BCR/ABL1 при хроническом миелоидном лейкозе [16], амплификацию HER2 при раке молочной железы [18; 20] и перестройку ALK при аденокарциноме легких [5; 11; 14; 17]. Флуоресцентно меченые ДНК-зонды гибридизируются с комплементарными хромосомными областями, это позволяет визуализировать локализацию анализируемого гена или ДНК-последовательности под микроскопом. Для детекции гибридизации применяют два основных подхода: прямой, при котором зонды метят флуоресцентными нуклеотидами, и непрямой, использующий репортерные молекулы (биотин, дигоксигенин), выявляемые впоследствии с помощью флуоресцентно меченных антител с последующей детекцией флуоресцентными антителами или авидином/стрептавидином обеспечивает усиление сигнала, что критично для малых ДНК-проб [1; 6; 17; 24; 29]. FISH-анализ использует различные флуорохромы – FITC, родамин, AMCA, Су-красители [8; 21].

FISH-анализ хромосомных aberrаций использует две основные системы номенклатуры: PAINT (описательная) и S&S (механистическая) [22; 28]. Номенклатура PAINT описывает каждую аномалию индивидуально, используя буквенные обозначения для окрашенных фрагментов, например, t(Ab) – центромерный участок контрастного цвета с FISH-окрашенным ацентрическим фрагментом [28]. Система S&S применяет буквенно-цифровые коды для комплексного

описания перестроек, для изучения механизмов их образования [22] Традиционная классификация разделяет транслокации на реципрокные (двусторонние), терминальные (односторонние) и интерстициальные (инверсии, вставки) [9].

Тиреоглобулин был первым геном человека с одной копией, который был картирован FISH в 1985 году. По сравнению с обычными методами G-бэндинга, FISH обеспечивает лучшую степень разрешения [17]. Исследования с использованием FISH-метода также внесли значительный вклад в изучение синдромов Прадера-Вилли и Ангельмана [4; 17].

Виды и модификации FISH технологий:

1) *ACM-FISH* (центромерный FISH) – модификация многоцветного метода FISH, которая позволяет выявлять числовые и структурные хромосомные аберрации в сперматозоидах. Аббревиатура ACM относится к одновременной гибридизации трех ДНК-зондов к ключевым областям хромосомы: центромере (альфа-сателлиты), 1q12 (классические сателлиты) и 1p36.3 (миди-сателлиты), спутников хромосомы 1 для специфического обнаружения дупликаций и делеций 1pter и 1cen, а также для идентификации хромосомных разрывов в области 1cen-1q12 [7; 27; 29];

2) *armFISH* (arms – плечи) метод – представляет собой усовершенствованную версию M-FISH, 42-цветный вариант, который позволяет анализировать p- и q-плечи 24-х хромосом человека (кроме p-плеча Y и акроцентрических). Технология сочетает стандартный M-FISH с плечеспецифичными зондами, обеспечивая детекцию перицентрических инверсий и других перестроек. Так, в частности, с помощью данного метода успешно исследовали хромосомную нестабильность в клеточных линиях глиомы [7];

3) *CARD-FISH* (катализируемое осаждение/депонирование репортера) – метод усиления сигнала с использованием олигонуклеотидного зонда помеченного пероксидазой хрена (HRP), которая осаждает флуоресцентные молекулы тирамина в участках связывания зонда. Разработанная модификация MICROCARD-FISH сочетает метод CARD с микроавтордиографией. С помощью этого

метода вполне возможно обнаружить, идентифицировать и количественно оценить микроорганизмы, участвующие в процессах биовыщелачивания. При этом, активные бактериальные клетки метят тритием (^3H -аспарагиновая кислота), с возможностью одновременной детекции: флуоресцентного сигнала (УФ-возбуждение), радиоактивных серебряных зерен (проходящий свет);

4) *catFISH* метод (*cellular compartment analysis of temporal activity by FISH*) – инновационный подход для исследования динамики нейронной активности, связанной с поведенческими реакциями и когнитивными процессами. В основе технологии лежит комбинация РНК-гибридизации *in situ* (РНК-FISH) на криосрезах с дальнейшей конфокальной микроскопией. Первоначально метод был разработан для изучения пространственно-временной экспрессии гена *Arg*-ранние гены ответа (IEG), маркера нейронной активности. *catFISH* позволяет одновременно анализировать клеточную локализацию транскриптов, динамику их экспрессии в различных отделах мозга;

5) *CB-FISH* (*цитохалазин В*) метод – технология была разработана при исследовании механизмов увеличения мозаичных диплоидных клеток *in vivo* при трисомии по 21 хромосоме при болезни Альцгеймера. Чувствительность метода значительно повышается при комбинации стандартного протокола *CB-FISH* с 24-цветной технологией *SKY*, позволяющей за одну гибридизацию идентифицировать ДНК хромосомы в микроядрах. Такой интегративный подход обеспечивает комплексный анализ хромосомных аномалий на клеточном уровне [27];

6) *CO-FISH* (*Chromosome Orientation-FISH*) – метод позволяет анализировать ориентацию хромосомных нитей путем специфической гибридизации с однострочечными ДНК-зондами после предварительного включения 5'-бромдезоксиуридина (BrdU) в новосинтезированную ДНК в S-фазе клеточного цикла с последующей селективной деградацией меченой цепи с помощью *Eco* III. Метод применяется для анализа Робертсоновских транслокаций и хромосомных инверсий. Первоначальная цель этого метода состояла в том, чтобы определить ориентацию tandemных повторов внутри центромерных областей хромосом [26];

7) *COBRA-FISH (Combined Binary Ratio FISH)* – метод мультиплексной флуоресцентной гибридизации, основанный на комбинаторном маркировании зондов с использованием от 3 до 5 флуорохромов в различных соотношениях, что позволяет создавать до 48 уникальных цветовых комбинаций для одновременной визуализации всех хромосом человека, их отдельных плеч, а также дополнительных последовательностей, включая вирусные вставки и гены с одной копией (рис 1Г);

8) *COD-FISH (Chromosome orientation and direction FISH, комбинированный метод оптического обнаружения CaCO_3 -FISH)* – метод поиска кальцифицирующих микроорганизмов в воде. Создание данного протокола было направлено на количественную оценку числа копий гена и продукции белка, для изучения вопросов транскрипции и трансляции [26];

9) *COMBO-FISH (COMbinatorial Oligonucleotide FISH)* – модификация метода FISH в которой отсутствует необходимость денатурации ДНК, что позволяет сохранять нативную структуру хроматина. В основе метода лежит использование комбинаторных гомопуриновых/гомопиримидиновых олигонуклеотидных зондов, которые при специфическом связывании с неповрежденной дуплексной геномной ДНК, образуют тройные спирали. Эти зонды длиной от 14 п.н. позволяют точно таргетировать специфические локусы размером около 250 кб (генома имеет 150–200 таких длин). Ключевое преимущество COMBO-FISH – возможность проведения 3D-анализа организации генома без нарушения ядерной архитектуры, что делает метод особенно ценным для изучения пространственной организации хроматина и эпигенетических модификаций в условиях, максимально приближенных к физиологическим [10];

10) *Comet-FISH* – гибридная методика, используется для оценки степени разрыва ДНК. Методика объединяет кометный анализ и FISH, которая позволяет оценивать повреждения ДНК в конкретных геномных локусах отдельных клеток (рис. 1Д). Метод основан на электрофоретическом разделении фрагментов ДНК с последующей гибридизацией флуоресцентных зондов к специфическим последовательностям в «голове» или «хвосте» ДНК-комет в агарозе на предметном

стекле с визуализацией в микроскоп. Исследования с использованием Comet-FISH показали, что чувствительность хромосомных регионов к повреждениям коррелирует с плотностью генов, а не с их размером. Техника особенно эффективна для анализа повреждений теломер и конкретных генов, что делает её ценным инструментом в исследованиях геномной стабильности и ДНК-репарации [7; 27];

11) *Cryo-FISH* – метод анализа пространственной организации генома, основанный на исследовании ультратонких (150 нм) погруженных в сахарозу криосрезов клеток. Эта технология превосходит традиционный 3D-FISH по сохранению нативной структуры хроматина и разрешающей способности. *Cryo-FISH* особенно эффективен для изучения хромосомных территорий и верификации данных о дальних хромосомных взаимодействиях, полученных другими методами (например, 4C-технологией);

12) *D-FISH (Dual Fusion FISH, двойное слияние)* – метод выявления хромосомных транслокаций в онкогематологии. Используется два флуоресцентных зонда для одновременной детекции обоих продуктов транслокации. Этот подход значительно повышает точность диагностики по сравнению с классическим FISH, минимизируя ложноотрицательные и ложноположительные результаты. Первоначально разработанный для выявления BCR/ABL-транслокации при хроническом миелоидном лейкозе, метод был адаптирован для диагностики ключевых транслокаций при BCR/ABL t(8;21) и t(6;9), PML/RARA и PBX1/E2A;

13) *DBD-FISH (DNA Breakage Detection/обнаружение разрывов ДНК FISH)* – метод детекции повреждений ДНК, основанный на предварительной щелочной денатурации ДНК с образованием одноцепочечных фрагментов в местах разрывов с последующей гибридизацией флуоресцентных зондов. Метод применяется для анализа фрагментации ДНК, используется репродуктивной медицине, например, для определения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов [27];

14) *Fiber-FISH (Fiber fluorescence in situ hybridization)* – высокоразрешающий метод цитогенетического анализа (с точностью до 1 т. п.н.), основанный на исследовании растянутых молекул ДНК, что позволяет точно картировать гены,

определять порядок генетических маркеров, анализировать структурные перестройки и оценивать вариации числа копий, при этом метод обеспечивает в 10–100 раз более высокое разрешение по сравнению с традиционным [29]. Метод позволяет определять относительные положения двух или более генов, или повторяющихся последовательностей ДНК (fiber-FISH), для картирования генов [23];

15) *Fusion-Signal FISH* – цитогенетический метод, используемый для детекции и локализации ДНК-последовательностей обнаружения слияния генов (fusion) или других аномалий хромосом (рис. 1А). Метод был разработан для выявления филадельфийской хромосомы t(9;22) у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, позволяя обнаруживать минимальную остаточную болезнь после трансплантации костного мозга. В основе метода – использование зондов к генам BCR и ABL, фланкирующих точки разрыва, что позволяет детектировать химерный транскрипт BCR/ABL. Со временем метод адаптировали для диагностики других гематологических заболеваний, включая t(15;17) – PML/RARA, ОМЛ, неходжкинские лимфомы, мантийноклеточную лимфому и детский В-клеточный острый лимфобластный лейкоз [27]. Для исключения ложноположительного и ложноотрицательного результата был разработан D-FISH – модификация с двойным слиянием, используя крупные зонды для одновременной детекции BCR/ABL и ABL/BCR;

16) *Halo-FISH* – метод, применяемый для анализа структуры хроматина. Клетки подвергаются пермеабиллизации и экстракции солевым раствором, что удаляет растворимые белки и высвобождает участки ДНК. В результате вокруг ядра образуется «гало» из протяжённых петель хроматина, что позволяет проводить FISH с высоким разрешением. Метод универсален: используются зонды к α -сателлитам, теломерам, SAR/MAR-участкам, генам и целым хромосомам. Особенно метод эффективен для анализа компактной ДНК сперматозоидов (SpermHalo-FISH) [7];

17) *Harlequin-FISH* – сочетает FISH-гибридизацию с дифференциальным окрашиванием сестринских хроматид после инкубации с BrdU, что позволяет

идентифицировать клетки в период митоза и количественно оценивать хромосомные повреждения, включая обмены сестринскими хроматидами (SCE), благодаря характерному «арлекиновому» рисунку окрашивания, при этом метод особенно ценен для биодозиметрии и оценки генотоксических эффектов, поскольку обеспечивает селективный анализ клеток на разных стадиях клеточного цикла с высокой чувствительностью к радиационным и химическим повреждениям ДНК [26];

18) *Immuno-FISH* – сочетает FISH-гибридизацию с иммунофлуоресцентным детектированием белков, что позволяет одновременно исследовать пространственную организацию специфических геномных локусов и их ассоциацию с ядерными структурами (ядрышками, PML-тельцами/промиелоцитарного лейкоза) и эпигенетическими маркерами [29];

19) *LNAs-FISH* – использует модифицированные замкнутые/закрытые нуклеиновые кислоты (LNA), которые благодаря своей уникальной химической структуре образуют более стабильные А-образные спирали к спирали типа В с ДНК/РНК, что значительно повышает термостабильность гибридизации (температура плавления увеличивается на 2–8°C на каждый LNA-нуклеотид) и позволяет создавать высокочувствительные зонды длиной 8–16 нуклеотидов для детекции малых РНК (таких как miRNA) и низкоэкспрессируемых мишеней [7];

20) *e-FISH* – результаты гибридизационных тестов можно предсказать с помощью инструмента моделирования FISH на основе BLAST, известного как e-FISH. Это приложение было создано как биоинформационный инструмент для выбора лучших генетических зондов для гибридизации [29];

21) *Flow-FISH* – высокопроизводительная технология анализа длины теломер, сочетающую PNA-зондирование с проточной цитометрией, что позволяет быстро измерять теломерные повторы в тысячах клеток одновременно. Метод нашел широкое применение в исследованиях старения, поддержания теломер и характеристике гемопоэтических стволовых клеток, а его модификация с имму-

нофенотипированием позволяет анализировать теломерную динамику в конкретных клеточных популяциях. Технология также адаптирована для микробиологических исследований [29];

22) *M-FISH (Multiplex-FISH)* – 24-цветный метод кариотипирования, основанный на комбинаторной маркировке хромосомных зондов пятью спектрально различимыми флуорофорами, что позволяет однозначно идентифицировать все хромосомы человека и анализировать сложные перестройки, включая маркерные хромосомы и субтеломерные аномалии (рис. 1Е). Метод был адаптирован для специфических задач цитогенетики через модификации: *cenM-FISH* для центромерного анализа, *CM-FISH* для небольших маркерных хромосом, *M-TEL* для теломерных исследований и *armFISH* для выявления перичентрических инверсий, а родственная технология *SKY* (спектральное кариотипирование) использует аналогичный принцип комбинаторного окрашивания [29];

23) *ML-FISH (Multilocus or ML-FISH)* – метод одновременного анализа нескольких геномных локусов с использованием комбинации множества специфических ДНК-зондов, первоначально разработанный для диагностики микроделеционных синдромов у пациентов с задержкой развития, мейотических ошибок (нерасхождения хромосом 13 и 21) в ооцитах человека [13];

24) *PCC-FISH (Premature Chromosome Condensation)* – метод радиационной биодозиметрии, основанный на анализе преждевременно конденсированных хромосом (PCC) в G1/G2-фазе клеточного цикла с использованием хромосом-специфичных FISH-зондов, позволяющий количественно оценивать радиационно-индуцированные хромосомные aberrации без необходимости культивирования клеток. Метод нашел применение в оценке радиочувствительности опухолей, мониторинге лучевого воздействия *in vivo* (включая случаи локального переооблучения), исследовании радиосенсибилизирующих препаратов, фундаментальных радиобиологических исследованиях, демонстрируя преимущества перед традиционным анализом метафазных хромосом за счет сокращения времени анализа и возможности работы с неделящимися клетками. Влияние воздействия

высоких или низких доз всего тела на периферические лимфоциты человека с тех пор рассчитывалось с помощью этого метода [29];

25) *PNA-FISH (Peptide Nucleic Acid, пептидная нуклеиновая кислота)* – использует синтетические пептидные нуклеиновые кислоты, которые являются синтетическими аналогами ДНК, с нейтральным пептидным остовом, которые обеспечивают повышенную стабильность гибридизации с ДНК/РНК за счет отсутствия электростатического отталкивания. Что в свою очередь позволяет разрабатывать высокоспецифичные 15–18-мерные зонды, способные различать одонуклеотидные вариации, при анализе теломерных повторов и центромерных α -сателлитных последовательностей. Метод успешно адаптирован количественного измерения длины теломер в метафазных и интерфазных клетках и идентификации хромосом в предимплантационной диагностике, неинвазивного пренатального тестирования (детекция мРНК γ -глобина плода), а также для микробиологических исследований благодаря способности PNA эффективно проникать через клеточные стенки микроорганизмов, что делает технологию перспективной платформой для разработки аллель-специфичных зондов нового поколения [7];

26) *Q-FISH (Quantitative/количественное)* – метод количественного анализа подсчета числа теломерных повторов в хромосоме с разрешением 200 п.н., основанный на использовании PNA-зондов и программного анализа флуоресцентных сигналов (TFL-TELO) (рис. 1Б). Первоначально разработанный для метафазных хромосом, а затем адаптированный для интерфазных клеток (IQ-FISH) и тканевых срезов, метод позволил исследовать роль теломер в процессах старения и онкогенеза. Метод также совместим с проточной цитометрией (Flow-FISH) [26; 29];

27) *QD-FISH (Quantum Dot)* – метод с использованием квантовых точек (QD) в качестве неорганических наноразмерными флуорофорами, отличающийся повышенной фотостабильностью и узким спектром излучения, что позволяет проводить высокочувствительную детекцию нуклеиновых кислот. Современные модификации метода включают как классическую схему с биотинилированными зондами и стрептавидин-QD конъюгатами, так и прямую маркировку

олигонуклеотидных зондов квантовыми точками, что повышает точность анализа пространственного распределения мРНК в клетках и тканях. Метод широко используется для исследования спермы человека, метафазных хромосом человека, бактериальных клеток, а также на срезах тканей для анализа субклеточного распределения мРНК [29];

28) *Rainbow-FISH (радуга)* – с помощью данного метода можно одновременно обнаружить и количественно оценить до семи отдельных групп микроорганизмов на небольшой площади с целью различить несколько филогенетических групп бактерий на основе анализа 16S рРНК-целевых олигонуклеотидных зондов [29];

29) *Raman-FISH* – это метод исследования экофизиологии сложных микробных сообществ, который объединяет FISH и Рамановскую микроспектроскопию/Raman microspectroscopy [29]. Метод использует «явление красного смещения» или модификацию резонансных спектров, которая возникает в результате анаболического включения изотопа ^{13}C в клетки микроорганизмов в отличие от обычного ^{12}C . Для структурных и функциональных исследований сообществ микроорганизмов в клетку включается стабильный изотоп с последующей гибридизацией *in situ* с зондом 16S рРНК [26];

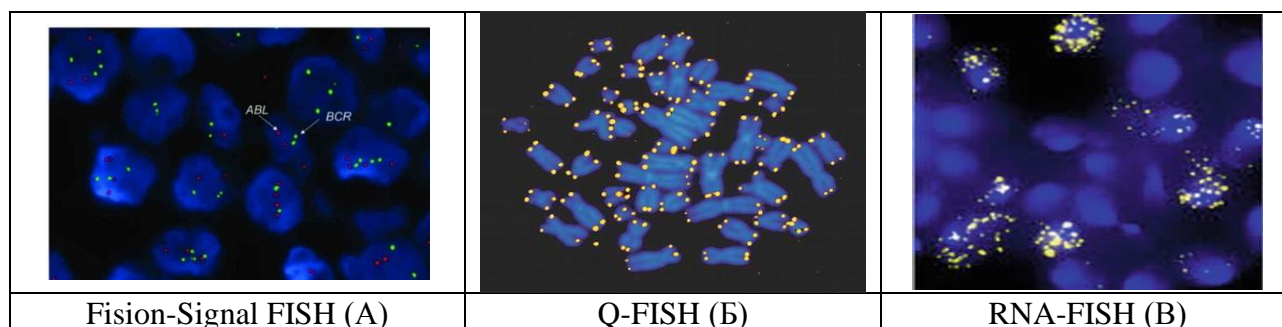
30) *ReD-FISH (Replicative Detargeting)* – метод анализа временных параметров репликации ДНК, основанный на включении BrdU в дочернюю цепь с последующей детаргетинговой гибридизацией. Метод позволяет дифференцировать реплицированные (одинарный сигнал) и нереплицированные (двойной сигнал) хроматиды. Метод применяется для изучения теломерной репликации, выявляя асинхронность репликации р- и q-теломер одной хромосомы и их репликацию на протяжении всей S-фазы клеточного цикла [29];

31) *Reverse-FISH (обратный FISH)* – исследуемая ДНК используется в качестве зонда для гибридизации с референсными метафазными хромосомами, что позволяет идентифицировать хромосомное происхождение и состав неизвестного генетического материала, при этом метод особенно эффективен для харак-

теристики структурных хромосомных аномалий, включая маркерные хромосомы и ампликоны в опухолевых клетках, а его вариации используют различные источники ДНК-зондов, такие как гибридные соматические клетки, сортированные хромосомы или микродиссектированный хромосомный материал, обеспечивая точное картирование геномных перестроек [7];

32) *RING-FISH (Recognition of Individual Genes)* – высокочувствительный вариант FISH-анализа отдельных генов микроорганизмов, при котором используются концентрированные полинуклеотидные зонды, которые образуют сигнальные сети за счет межмолекулярных взаимодействий, обеспечивая детекцию низкокопийных генетических мишеней с характерным кольцеобразным паттерном флуоресценции на клеточной периферии. Метод расширяет возможности идентификации и визуализации бактерий в сложных экологических образцах по сравнению со стандартными олигонуклеотидными зондами. Из-за отличительного кольцевого, галоподобного сигнала гибридизации методу также дали название «ring-FISH» [27];

33) *RNA-FISH* – метод в фиксированных образцах позволяет пространственно визуализировать внутриклеточные РНК-транскрипты проводить анализ экспрессии генов на уровне отдельных клеток, включая аллель-специфическую экспрессию, транскрипционную активность вирусных геномов и трансгенов. Технология применяется для изучения функциональной организации генома, ядерной архитектуры и в качестве диагностического инструмента при миотонической дистрофии 1 типа (рис. 1В) [29];



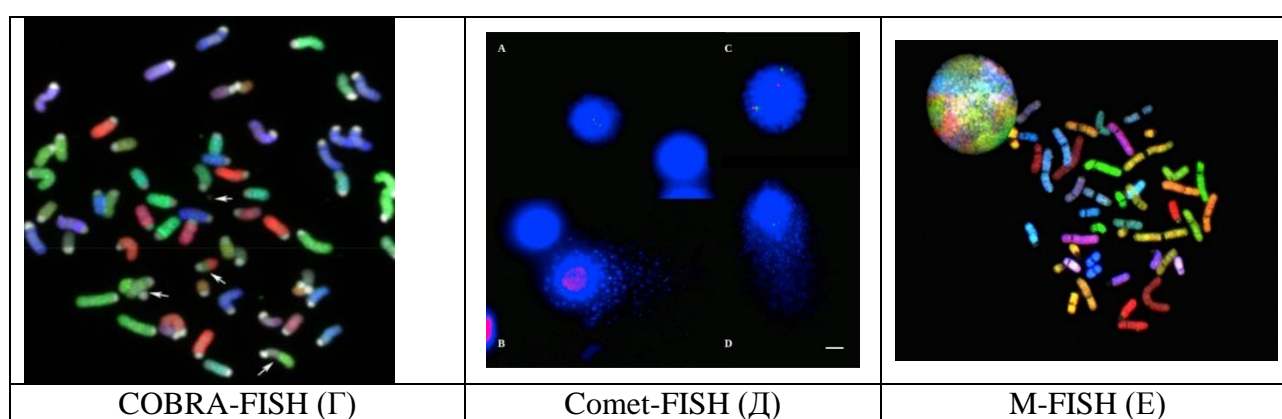


Рис. 1. Некоторые примеры FISH-методов визуализации

34) *Rx-FISH (Cross Species Color Banding/межвидовое цветное окрашивание)* – двухцветный метод, который часто называют хромосомным штриховым кодированием (баркодирование), основанный на межвидовой гибридизации. С использованием данного метода провели гибридизацию ДНК человека и приматов, выявили 98% сходства последовательностей ДНК. В онкогематологии метод применяется для идентификации часто встречающихся хромосомных транслокаций генов. Метод может использовать и 3 флуорохрома, что позволяет выявлять внутрихромосомные перестройки (инверсии, делеции), что сложнее выявить при G-бэндинге. В комбинации с G-бэндингом метод используется для определять точки разрыва хромосом [29];

35) *Stellaris RNA FISH (Single-Molecule RNA FISH, одно молекулярная РНК FISH)* – метод идентификации и количественной оценки мРНК и других длинных молекул РНК в тонком слое образцов тканей [27];

36) *Telomere-FISH или Tyramide-FISH* – T-FISH означает тирамид (TSA) или теломера. Тирамид, легко связывается с пероксидазой на парафиновых срезах ткани, использовался для повышения чувствительности. В данной технике используется пероксидазно-конъюгированное антигаптенное антитело или стрептавидин, для связывания с меченым зондом. Флуорохромы или гаптены, такие как биотин, конъюгируются с производными тирамина, что приводит к образованию массивных скоплений флуоресцентных молекул, или «башен», для визуализации. Метод широко используется для картирования локусов генов и поиска

транскриптов в клетках и тканях предварительно либо замороженных или зафиксированными и залитыми в парафин.

Некоторые группы используют термин T-FISH для обозначения методов FISH с использованием теломерных зондов, предназначенных для исследования теломерных последовательностей и структуры. Термин T-FISH был введен в 2003 году Nomura и его коллегами. Описаны три варианта T-FISH – тирамид-FISH, тканевый-FISH и теломе-FISH [7; 26; 27];

37) *Split-Signal FISH* – чувствительный двухцветный метод, применяется для выявления частых хромосомных транслокаций в онкогематологии, как в период метафазы, так и в случае интерфазного состояния хроматика. Метод основан на использовании двух дифференциально меченых зондов, фланкирующих точку разрыва транслокации. В норме сигналы сливаются, но при транслокации разделяются. Изначально Split-Signal FISH разрабатывался для детекции транслокаций гена MLL при остром лимфобластном и миелобластном лейкозе. Аналогичный подход ранее применялся для выявления транслокаций, таких как t(8;14) при лимфоме Беркитта и t(11;14) при мантийноклеточной лимфоме;

38) *3-D FISH* – был разработан в Германии группами под руководством Lichter P. и Kremer T. для исследования трехмерного расположения хромосом и субхромосомных областей ядер клеток. Метод основан на фиксации ядер параформальдегидом, для сохранности организации хроматина, пермеабиллизации детергентами и замораживании при -180°C , чтобы зонды могли проникнуть внутрь. Визуализация осуществляется с помощью конфокальной микроскопии или методов деконволюции [29];

39) *Zoo-FISH* – процесс идентификации синтенных (на одной и той же хромосоме) областей с использованием zoo-FISH, иногда называемый межвидовой окраской хромосом, который подразумевает смешивание библиотек последовательностей ДНК из хромосом разных видов организмов [27];

40) *CGH-FISH (Comparative Genomic Hybridization, сравнительная геномная гибридизация)* – представлена в 1992 году и была одним из важнейших достижений в технологии FISH с точки зрения полногеномного скрининга [29; 30].

Проточная цитометрия для визуализации и анализа хромосом человека.

Хромосомный анализ традиционно выполняется путем кариотипирования на метафазных пластинах или FISH на интерфазных клетках. Проточная цитометрия была представлена как новый метод анализа числа хромосом (плоидности) и структуры (длины теломер) в 1970-х годах с интерпретацией данных, основанной на интенсивности флуоресценции. Недавним достижением стало иммунофенотипирование, благодаря которому экспрессия антигена может использоваться для идентификации конкретных клеток, представляющих интерес для конкретных хромосом и их аномалий. Эта возможность была продемонстрирована на примере рака крови [25].

Технология FISH является бесценным инструментом как для определения и мониторинга приобретенных хромосомных аномалий, связанных с неоплазиями так и надежным средством для мониторинга ответа на терапию. Внедрение FISH в рутинную диагностическую лабораторию требует понимания целесообразности применения различных методов данной технологии в зависимости от поставленной задачи, обучения лиц, которые будут проводить тестирование. Поскольку число критических локусов, вовлеченных в неопластические перестройки хромосом или числовые аномалии, продолжает расширяться, соответственно увеличится разнообразие зондов FISH с более высокой специфичностью и чувствительностью.

Список литературы

1. Нугис В.Ю. FISH-метод: способ цитогенетической ретроспективной оценки дозы (обзор) / В.Ю. Нугис // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2016. – №12 (4). – С. 671–678. EDN YPYFKV
2. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance // Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research. 2010. Vol. 3. №1. Pp. 85–95.
3. Boyd C., Boyle D. Molecular diagnosis on tissues and cells: how it affects training and will affect practice in the future // Cytopathology. 2012. №23 (5). – Pp. 286–294.

4. Carter D. How fluorescence in situ hybridization (FISH) fits into cancer care The University of Texas MD Anderson Cancer Center // The University of Texas MD Anderson Cancer Center. 2021.
5. Casaluce F., Sgambato A., Maione P. [et al.]. C. ALK inhibitors: a new targeted therapy in the treatment of advanced NSCLC // Target Oncol. 2013. №8 (1). Pp. 55–67. DOI 10.1007/s11523-012-0250-9. EDN UMBEYJ
6. Casper R.M., Leonard K., Mpho M., Bono N. Recent Molecular Techniques in Cytogenetics. 2025.
7. Chen J., Shi Q., Zhang J. [et al.]. Detection of mosaic chromosome 21 aneuploidy in vivo with CB-FISH method // Chinese journal of medical genetics. 2000. Vol. 17 (3). Pp. 196–199.
8. Chudova I. Fluorescence in situ hybridization. In: Chromosomal alterations: methods, results and importance in human's health. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 2007. Pp. 285–299.
9. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies // Vienna: IAEA. 2011. P. 229.
10. de Barros A.V., Sczepanski Th.S., Cabrero J., Artoni R.F. Fiber FISH reveals different patterns of highresolution physical mapping for repetitive DNA in fish. // Aquaculture. 2018. Vol. 322. Pp. 47–50.
11. Dhabe A., Islam R., Ramakrishnan K., Parihar M. Role of Cytogenetics and FISH in laboratory workup of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia // Indian J Med Paediatr Oncol. 2023. №44 (05). Pp. 482–493. DOI 10.1055/s-0043-1766133. EDN VXODKF
12. Dietel M., Johrens K., Laffert M. [et al.]. Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance // Cancer Gene Ther. 2013. №20 (4). Pp. 211–221.
13. Eckel H., Kleinstein J., Wieacker P., Stumm M. Multi-locus (ML)-FISH is a reliable tool for nondisjunction studies in human oocytes // Cytogenet. Genome. 2003. №103. Pp. 47–53.

14. Gandhi L., Janne P. Crizotinib for ALK-rearranged non-small cell lung cancer: a new targeted therapy for a new target // Clin Cancer Res. 2012. Vol. 18 (14). Pp. 3737–3742.
15. Hu L., Ru K., Zhang L. [et al.]. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine // Biomarker Research. 2014. Vol. 2. DOI 10.1186/2050-7771-2-3. EDN EEHUMZ
16. Jiang H., Xue Y., Wang Q. [et al.]. The utility of fluorescence in situ hybridization analysis in diagnosing myelodysplastic syndromes is limited to cases with karyotype failure // Leuk Res. 2012. №36 (4). Pp. 448–452.
17. Khalaf S.D., Alhamadany A.Y., Kader M.A. Fluorescence in situ hybridization (FISH): types and application: a review // NTU Journal of Pure Sceinces. 2023. №2 (2). Pp. 37–53.
18. Kim H., Lim S., Kim H. [et al.]. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma // Ann Oncol. 2013. №24 (9). Pp. 2364–2370.
19. Landau D., Wu C. Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics // Genome Med. 2013. №5 (5):47.
20. Pathmanathan N., Bilous A. HER2 testing in breast cancer: an overview of current techniques and recent developments // Pathology. 2012. №44 (7). Pp. 587–595.
21. Rubtsov N. Hybridization of nucleic acids in situ in the analysis of chromosomal abnormalities. In: Molecular genetic methods in diagnostics of hereditary diseases and cancer. Introduction to molecular diagnostics // Moscow: Meditsina. – 2011. Vol. 2. Pp. 100–136.
22. Savage J., Simpson P. On the scoring of FISH- «painting» chromosome-type exchange aberrations // Mutat Res. 1994. №307 (1). Pp. 345–353.
23. Shakoori AR. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications // Chromosome Structure and Aberrations. 2017. №10. Pp. 343–367.
24. Song J., Mooi WJ., Petronic-Rosic V. [et al.]. Nevus versus melanoma: to FISH, or not to FISH // Adv Anat Pathol. 2011. №18. Pp. 229–234.

25. Stanley J., Hui H., Erber W. [et al.]. Analysis of human chromosomes by imaging flow cytometry. *Cytometry Part B // Clinical Cytometry*. 2021. №100 (5). Pp. 541–553.
26. Tanke H.J., Wiegant J., van Gijlswijk R. [et al.]. New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: combined binary ratio labelling // *Eur. J. Hum. Genet*. 1999. №7. Pp. 2–11.
27. Tubbs R., Pettay J., Roche P. [et al.]. Concomitant oncoprotein detection with fluorescence in situ hybridization (CODFISH): a fluorescence-based assay enabling simultaneous visualization of gene amplification and encoded protein expression // *J. Mol. Diagn*. 2000. №2. Pp. 78–83.
28. Tucker J., Morgan W., Awa A. [et al.]. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting // *Cytogenet Cell Genet*. 1995. №68 (3–4). Pp. 211–221.
29. Volpi E.V., Bridger J.M. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. 2018.
30. Volpi E.V., Bridger J.M. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique // *BioTechniques*. 2008. №45. Pp. 385–409. DOI 10.2144/000112811. EDN MMGAIL
31. Wertheim G., Hexner E., Bagg A. Molecular-based classification of acute myeloid leukemia and its role in directing rational therapy: personalized medicine for profoundly promiscuous proliferations // *Mol Diagn Ther*. 2012. №16 (6). Pp. 357–369.
32. Wolff D., Bagg A., Cooley L. [et al.]. Guidance for Fluorescence in situ Hybridization Testing in Hematologic Disorders // *SPECIAL ARTICLE*. 2007. Vol. 9. №2. Pp. 134–143.