

Частота потерь хромосомных фрагментов и целых хромосом в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы спонтанных абортусов с анеуплоидией и триплоидией

Васильев С.А.^{1,2*}, Уразова А.С.², Никитина Т.В.¹, Саженова Е.А.¹,
Толмачева Е.Н.¹, Агаб А.В.³, Жигалина Д.И.², Лебедев И.Н.^{1,2,3}

¹ — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск; * stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

Актуальность. Числовые хромосомные нарушения — одни из наиболее значительных для клетки и организма генетических повреждений. Известно, что анеуплоидия может вызывать хромосомную нестабильность в опухолевых клетках. Однако остается неизвестным, приводит ли наличие числовых хромосомных нарушений в клетке к индукции хромосомной нестабильности в эмбриогенезе. **Цель.** Настоящая работа направлена на выявление влияния числовых хромосомных нарушений на частоту потерь хромосомных фрагментов и целых хромосом в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы спонтанных абортусов I триместра беременности. **Материалы и методы.** Проведен анализ частоты центромеро-негативных микроядер, содержащих хромосомные фрагменты, и центромеро-позитивных микроядер, образующихся вокруг целых отстающих в ходе митоза хромосом, в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы 21 спонтанного абортуса с различными кариотипами (9 абортусов с нормальным кариотипом, 7 абортусов с анеуплоидией, и 5 абортусов с триплоидией). В качестве контрольной группы были исследованы 19 медицинских абортусов I триместра. **Результаты.** Несмотря на повышенную частоту хромосомного отставания в подгруппе спонтанных абортусов с анеуплоидией по сравнению со спонтанными абортусами с нормальным кариотипом и медицинскими абортусами, статистически значимых отличий обнаружено не было. **Выводы.** Для возникновения хромосомной нестабильности в эмбриогенезе человека недостаточно наличия числовых хромосомных нарушений в клетке, что указывает на существование механизмов поддержания стабильности генома в экстраэмбриональных тканях, нечувствительных к анеуплоидии и полиплоидии.

Ключевые слова: анеуплоидия, хромосомное отставание, микроядерный тест, FISH, экстраэмбриональная мезодерма

Loss of chromosome fragments or whole chromosomes in fibroblasts of extraembryonic mesoderm of spontaneous abortions with aneuploidy and triploidy

Vasilyev S.A.^{1,2*}, Urazova A.S.², Nikitina T.V.¹, Sazhenova E.A.¹,
Tolmacheva E.N.¹, Agab A.V.³, Zhigalina D.I.², Lebedev I.N.^{1,2,3}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRCM, Tomsk, Russia; * stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

² — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ — Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Numerical chromosome abnormalities are the most significant genetic failures. It is known that chromosomal aneuploidy may cause instability in tumor cells. However, it remains unknown whether the presence of numerical chromosome abnormalities in cell leads to the induction of chromosomal instability in embryogenesis. **Goal.** This work aims to identify the impact of numerical chromosome abnormalities on the frequencies of chromosome fragment and whole chromosome loss in fibroblasts of extraembryonic mesoderm of I trimester spontaneous abortions. **Materials and methods.** The frequencies of centromere-negative micronuclei containing the chromosome fragments, and centromere-positive micronuclei formed around the whole lagging chromosomes, were assessed in fibroblasts of extraembryonic mesoderm of 21 spontaneous abortions with different karyotypes (9 abortions with normal karyotype, 7 abortions with aneuploidy, and 5 triploid abortions). Nineteen induced abortions were used as a control group. **Results.** Despite the increased frequency of chromosome loss in the subgroup of spontaneous abortions with aneuploidy compared with spontaneous abortions with normal karyotype and induced abortions, significant differences were not found. **Conclusions.** Presence of aneuploidy is not enough for induction of chromosome instability in human cells indicating the existence of mechanisms of genome stability maintenance in the extraembryonic tissues, which are non-sensitive to aneuploidy and polyploidy.

Key words: aneuploidy, chromosome loss, micronucleus test, FISH, extraembryonic mesoderm

Введение

Одним из наиболее значительных для клетки и организма генетических повреждений являются числовые хромосомные нарушения, включающие анеуплоидию и полиплоидию [1]. Наличие анеуплоидии в клетке приводит к одновременному изменению дозы нескольких тысяч генов, что, в свою очередь, может привести к разбалансировке множества клеточных процессов, и, как следствие, к геномной нестабильности. Полиплоидия, как кратное увеличение количества целых хромосомных наборов, также ведет к возрастанию частоты ошибок сегрегации хромосом, что хорошо показано в опухолевых клетках. Кроме того, полиплоидия связана с повышением пролиферативной активности клеток, что подтверждается исследованиями на опухолевых клетках и на клетках цитотрофобласта при полном пузырном заносе, вызванном триплоидией диандрогенетического происхождения. Известно, что в опухолях возникающая анеуплоидия может вызывать хромосомную нестабильность [1, 2]. Однако остается неизвестным, приводят ли числовые хромосомные нарушения к индукции хромосомной нестабильности в эмбриогенезе на фоне высокой пролиферативной активности внезародышевых плацентарных тканей. В связи с этим, целью настоящего исследования стал анализ частоты потерь хромосомных фрагментов и целых хромосом в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы спонтанных абортусов с числовыми хромосомными нарушениями.

Материалы и методы

В качестве материала были использованы образцы экстраэмбриональной мезодермы 21 спонтанного ($7,7 \pm 0,4$ недель) и 19 медицинских ($8,6 \pm 0,5$ недель) абортусов I триместра беременности, полученные от женщин после подписания информированного согласия. Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ медицинской ге-

нетики», г.Томск (протокол № 3 от 02.06.2015). Кариотипы спонтанных абортусов были установлены путем стандартного кариотипирования и сравнительной геномной гибридизации (CGH) в соответствии с опубликованным протоколом [3]. Это позволило разделить выборку спонтанных абортусов на три подгруппы: с нормальным кариотипом (9 эмбрионов), анеуплоидией по отдельным хромосомам (7 эмбрионов) и триплоидией (5 эмбрионов) (табл. 1).

Фибробласты, полученные из экстраэмбриональной мезодермы абортусов, культивировали в среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США). Для блокирования цитокинеза клетки культивировали 72 ч в присутствии цитохалазина В (Sigma, США) в концентрации 5 мкг/мл, после чего клетки снимали раствором трипсина (Sigma, США) и фиксировали модифицированным фиксатором Карнуа (метанол : уксусная кислота — 3:1). Методом FISH с использованием панцентромерных ДНК-зондов в цитокинез-блокированных клетках определяли частоту центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер, нуклеоплазматических мостов. Реакцию FISH и анализ микроядер проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [4]. Анализировали 1000—1500 клеток на один образец. Статистическую оценку проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft).

Результаты и обсуждение

Частота центромеро-позитивных микроядер, являющихся маркером хромосомного отставания, была повышена в группе спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами, хотя статистически значимых отличий обнаружено не было (табл. 2). Повышение частоты хромосомного отставания в подгруппах

Результаты кариотипирования спонтанных абортусов I триместра беременности

Таблица 1

Нормальный кариотип		Анеуплоиды		Триплоиды	
Образец	Кариотип	Образец	Кариотип	Образец	Кариотип
NK1	46,XY	A1	45,X	T1	69,XYX
NK2	46,XY	A2	47,XY,+22	T2	69,XYX
NK3	46,XX	A3	47,XX,+21	T3	69,XXY
NK4	46,XY	A4	47,XX,+16	T4	69,XXX
NK5	46,XX	A5	47,XX,+16	T5	69,XXY
NK6	46,XY	A6	47,XY,+6		
NK7	46,XY	A7	47,XX,+22		
NK8	46,XX				
NK9	46,XX				
NK10	46,XX				

Частота центромеро-негативных, центромеро-позитивных микроядер и нуклеоплазматических мостов в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы (‰)

Группа		MnC–	p	MnC+	p	Мосты	p
Спонтанные абортусы	НК	4,4 ± 0,8	0,43	1,8 ± 0,5	0,48	2,1 ± 1,0	0,61
	Анеуплоиды	3,8 ± 1,7	0,09	3,3 ± 1,4	0,52	2,6 ± 1,6	0,85
	Триплоиды	14,3 ± 10,1	0,92	5,8 ± 3,7	0,92	4,8 ± 3,0	0,64
	Объединенная выборка	6,4 ± 2,4	0,22	3,3 ± 1,0	0,98	2,9 ± 1,0	0,84
Медицинские абортусы		5,8 ± 0,9		2,7 ± 0,6		1,7 ± 0,5	

Примечание. MnC– — центромеро-негативные микроядра; MnC+ — центромеро-позитивные микроядра; НК — нормальный кариотип. Данные представлены в виде среднего значения с ошибкой среднего. Значение p указано по сравнению с группой медицинских абортусов (критерий Манна–Уитни).

анеуплоидов и триплоидов по сравнению со спонтанными абортусами с нормальным кариотипом также оказалось статистически незначимым. Кроме того, частота центромеро-негативных микроядер, содержащих ацентрические фрагменты хромосом, также не отличалась статистически значимо между всеми исследованными группами (табл. 2). Таким образом, изменение числа хромосом не приводило к статистически значимому повышению частоты потерь хромосомных фрагментов и целых хромосом в клетках экстраэмбриональной мезодермы спонтанных абортусов с аномальным кариотипом.

Большинство исследований влияния анеуплоидии на возникновение хромосомной нестабильности были выполнены с использованием опухолевых клеточных линий [1, 2]. Однако в опухолевых клетках, помимо анеуплоидии, имеется множество нарушений на других уровнях организации генетического материала, включая мутации и эпимутации генов, участвующих в контроле клеточного цикла, репарации ДНК и расхождении хромосом в митозе. Возможно, что неопухолевые дифференцированные клетки, не имеющие таких нарушений, более устойчивы к возникновению хромосомной нестабильности, и для ее индукции недостаточно наличия анеуплоидии по отдельным хромосомам. Действительно, в исследовании на анеуплоидных дифференцированных клетках различных тканей человека, включавшем несколько образцов тканей плаценты, было обнаружено лишь небольшое повышение частоты анеуплоидии по хромосомам 2 и 17 [5]. С другой стороны, в лимфоцитах периферической крови больных с трисомией 13, 18, 21 и моносомией X обнаружено значимое повышение частоты анеуплоидии по хромосомам 8, 15 и 16 [6, 7].

Полученные в ходе настоящего исследования данные свидетельствуют о том, что для возникновения хромо-

сомной нестабильности в эмбриогенезе человека недостаточно наличия числовых хромосомных нарушений в клетке. Вероятно, что существуют механизмы поддержания стабильности генома в экстраэмбриональных тканях, нечувствительные к анеуплоидии и полиплоидии.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01003 и Стипендии Президента РФ № СП-3647.2015.4.

Список литературы

1. Nicholson JM, Cimini D. Link between aneuploidy and chromosome instability. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015; 315: 299-317.
2. Passerini V, Ozeri-Galai E, de Pagter MS et al. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. *Nat Commun.* 2016; 7: 10754.
3. Скрыбин НА, Лебедев ИН, Артюхова ВГ и др. Молекулярное кариотипирование по внеклеточной ДНК бластоцеля как основа неинвазивного преимплантационного генетического скрининга анеуплоидий. *Генетика.* 2015; 51: 1301-1307.
4. Васильев СА, Величевская АИ, Вишневская ТВ и др. Фоновое количество фокусов γH2AX в клетках человека как фактор индивидуальной радиочувствительности. *Радиационная биология и радиэкология.* 2015; 55: 402-410.
5. Valind A, Jin Y, Baldetorp B, Gisselsson D. Whole chromosome gain does not in itself confer cancer-like chromosomal instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 21119-21123.
6. Reish O, Brosh N, Gobazov R et al. Sporadic aneuploidy in PHA-stimulated lymphocytes of Turner's syndrome patients. *Chromosome Res.* 2006; 14: 527-534.
7. Reish O, Regev M, Kanesky A et al. Sporadic aneuploidy in PHA-stimulated lymphocytes of trisomies 21, 18, and 13. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 133: 184-189.