

Анализ необычной морфологии хромосомы 21 хориона при неразвивающейся беременности

Карамышева Т.В.^{1*}, Гайнер Т.А.^{3,4}, Каримова О.Г.^{3,4}, Богомолов А.Г.^{1,2,5}, Рубцов Н.Б.^{1,2,5}

¹ ООО «Сибирские хромосомные технологии», ^{*}kary@bionet.nsc.ru, 630090, Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, д.10, офис 1332

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск)

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск)

⁴ ООО «Центр персонализированной медицины», г. Новосибирск

⁵ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Описан уникальный случай необычной морфологии одного из гомологов хромосомы 21. Первоначально хромосомная aberrация была выявлена стандартным методом GTG-дифференциального окрашивания, затем точно описана с помощью FISH анализа.

Ключевые слова: «замершая» беременность, хорион, хромосома 21, кариотипирование, хромосомная патология, синдром Дауна.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Программа «Старт», договор №1514ГЦ1/23453 от 09.09.2016).

Analysis of the unusual morphology of the chromosome 21 in chorion for the non-developing pregnancy

Karamysheva T.V.^{1*}, Gayner T.A.^{3,4}, Karimova O.G.^{3,4}, Bogomolov A.G.^{1,2,5}, Rubtsov N.B.^{1,2,5}

¹ Siberian Chromosome Technology, Ltd, ^{*}kary@bionet.nsc.ru, 630090, Novosibirsk, Russia, Prospekt Lavrentyeva, building 10, Office 1332

² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Center for Personalized Medicine, Ltd, Novosibirsk, Russia

⁵ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

A scientific study of the reasons of fetal losses is a crucial issue for infertility specialist and patients. According to Russian statistics, 45–88% of miscarriage is due to non-developing pregnancy, 11% of first pregnancies ends in a surgical abortion, the percent of miscarriage is 20%. One of the most common causes of miscarriage is the fetal chromosomal aberrations. This paper introduces a unique case of chromosome 21 with unusual morphology. The chromosomal aberration was firstly detected using GTG banding (G bands produced with trypsin and Giemsa) and then was precisely described with FISH analysis.

Keywords: non-developing pregnancy, chorion, chromosome 21, karyotyping, chromosome aberrations, down syndrome.

Введение

Исследование причин «замершей» беременности является крайне актуальной проблемой врачей-репродуктологов и пациентов. Согласно российской статистике, неразвивающаяся беременность составляет 45–88% от числа самопроизвольных аборт, 11% первых беременностей заканчиваются хирургическим аборт, а частота невынашивания беременности достигает 20% [1]. Одной из наиболее частых причин, вызывающих преждевременное прерывание беременности, является наличие хромосомных аномалий у плода.

Трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна) — одно из наиболее распространенных заболеваний (частота — 1—2 случая на 800—1000 живорожденных детей) [2].

Описаны три формы данного синдрома: регулярная трисомия (93% всех случаев), транслокационная (5%) и мозаичная (2%) [3]. Очень редко в результате хромосомной перестройки могут быть удвоены отдельные участки хромосомы 21. Критическим сегментом, ответственным за формирование основных признаков синдрома, является область 21q22. Чаще всего наблюдается транслокация, когда в наборе имеются две нормальные хромосомы 21, одна нормальная хромосома группы D и крупная аномальная непарная хромосома, представляющая собой соединение q-плечей одной из трех 21-й и второй, например, 15-й хромосомы (транслокационные варианты 21/13, 21/14 или 21/15). Другой формой транслокации при болезни Дауна может быть соединение между собой двух хромосом 21 из трех имеющихся

в хромосомном наборе (21/21). Описаны единичные случаи тетрасомии 21q, которые, в основном, проявляются в виде мозаичных форм и связаны с изохромосомой 21q [4]. Моносомия 21 в большей части известных случаев летальна. Синдром моносомии 21q обусловлен делецией длинного плеча хромосомы, а также кольцевой хромосомой 21 [5]. Нами описан удивительный феномен необычной морфологии одного из гомологов хромосомы 21, выявленной в хорионе при «замершей» беременности.

Целью исследования являлся анализ кариотипа хориона при «замершей» беременности стандартными цитогенетическими и современными молекулярно-цитогенетическими методами.

Материалы и методы

GTG-Дифференциальное окрашивание

Проанализирован хорион абортного материала от женщины в возрасте 29 лет с подтвержденным диагнозом неразвивающаяся беременность. Операционный материал, представленный элементами хориона, был доставлен в течение часа после операции в цитогенетическую лабораторию Центра персонализированной медицины, г. Новосибирска. Препараты метафазных хромосом получали из клеток цитотрофобласта ворсинчатого хориона, «прямым» методом по общепринятой методике [6]. По окончании гипотонической обработки клетки фиксировали смесью этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Мацерацию клеток проводили в 70%-ном растворе уксусной кислоты. GTG-дифференциальное окрашивание хромосом проводили стандартным методом [7]. После предварительной обработки, с применением трипсина, хромосомы окрашивали раствором красителя Гимза, приготовленным на фосфатном буфере. Цитологические препараты анализировали на световом микроскопе OLYMPUS CX41 (Япония), для регистрации изображения использовали видеокамеру и программное обеспечение ВидеоТест-Карио 3.1 фирмы ООО Иста-Видео Тест (Россия).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

FISH хромосомоспецифичной ДНК-пробы с метафазными хромосомами проводили на препаратах, полученных из клеток цитотрофобласта ворсинчатого хориона при неразвивающейся беременности, окрашенных ранее методом GTG-дифференциального окрашивания. Для этого препараты отмывали от иммерсионного масла в трех сменах ксилола по 5 минут. Высушивали при комнатной температуре в течение 10 минут и отмывали от красителя Гимзы дважды, погружая препараты в стаканы с фиксатором (метанол + ледяная уксусная кислота, 3:1). Далее проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* согласно стандартному протоколу, без обработки пепсином [8, 9].

Хромосомоспецифичная ДНК-проба на хромосому 21 была получена согласно стандартным протоколам [8, 9]. Кратко, сбор материала хромосом проводили на инвертированном микроскопе Axiovert 10 (объектив 100x, окуляр 10x, Zeiss) с использованием оттянутой стеклянной иглы, контролируемой микроманипулятором MR (Zeiss). Собранный материал обрабатывали протеиназой K (Roche) и амплифицировали в полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером MW6 [10]. DOP-ПЦР и мечение флуорохромом TAMRA-dUTP проводили в дополнительных циклах ПЦР [8, 9].

In situ гибридизацию с теломерным FITC-конъюгированным (CCCTAA)₃ PNA зондом (пептидные нуклеиновые кислоты (peptide nucleic acid (PNA)) зонд) (PBIO/Biosearch Product, Bedford, MA) проводили, согласно методике описанной Lansdorf [11].

После гибридизации *in situ* хромосомы окрашивали красителем DAPI (Sigma). Хромосомы и хромосомные районы идентифицировали, анализируя GTG-окрашивание и инвертированный DAPI-бэндинг. Для описания хромосом и хромосомных районов использовали стандартную номенклатуру хромосом человека [12].

Микроскопию препаратов после FISH проводили на люминесцентном микроскопе AXIOPlan2 Imaging (ZEISS), оборудованном Расо CCD-камерой и системой фильтров CHROMA, в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Изображения метафазных пластинок регистрировали и обрабатывали с использованием специализированной программы ISIS5 фирмы META-Systems GmbH.

Результаты

Цитогенетическое исследование метафазных хромосом ворсин хориона методом GTG-дифференциальной окраски (G bands by trypsin using Giemsa) выявило во всех исследованных клетках наличие хромосомы 21 необычной морфологии. Этот гомолог по размеру был значительно крупнее своего гомолога как по длине, так и по ширине, в то же время демонстрируя стандартный для 21-й хромосомы паттерн G-позитивных и G-негативных бэндов (рис. 1). Кариотип описан как 46,XX,der(21). Цитогенетическое обследование родителей с использованием метода GTG-дифференциального окрашивания не выявило в их кариотипах каких-либо аномалий.

Супрессионная флуоресцентная гибридизация *in situ* микродиссекционной ДНК-пробы специфичной хромосоме 21 полностью окрасила q-плечи обоих гомологов 21-й хромосомы хориона (рис. 2). Отсутствие сигнала на спутниках хромосом обусловлено супрессией гибридизации повторенных последовательностей 100-кратным избытком Cot1 ДНК, использованным при проведении FISH [8, 9].

FISH с использованием ДНК пробы, специфичной теломерным районам, дала сигнал в теломерных районах обоих гомологов 21-й хромосомы (рис. 3).

Обсуждение

При пренатальной диагностике выявление аномальных кариотипов, обусловленных структурными и численными вариациями хромосомы 21, имеют огромное значение. Трисомия по 21-й хромосоме или даже по ее небольшому району (21q22.1) приводит к множественным аномалиям развития, описанным как синдром Дау-

на [3, 13]. Выявленная в настоящем исследовании необычная морфология одного из гомологов 21-й хромосомы в клетках хориона, вероятно, не связана с дупликацией его длинного плеча, так как паттерн бэндов при GTG-дифференциальной окраске соответствует паттерну бэндов нормальной хромосомы. Результаты FISH с использованием полнохромосомной ДНК-пробы не выявили каких-либо структурных перестроек: длинные плечи обоих гомологов хромосомы 21 были полностью окрашены, и никаких сигналов не было выявлено на других хромосомах. При приготовлении препаратов метафазных хромосом происходит их распластывание на

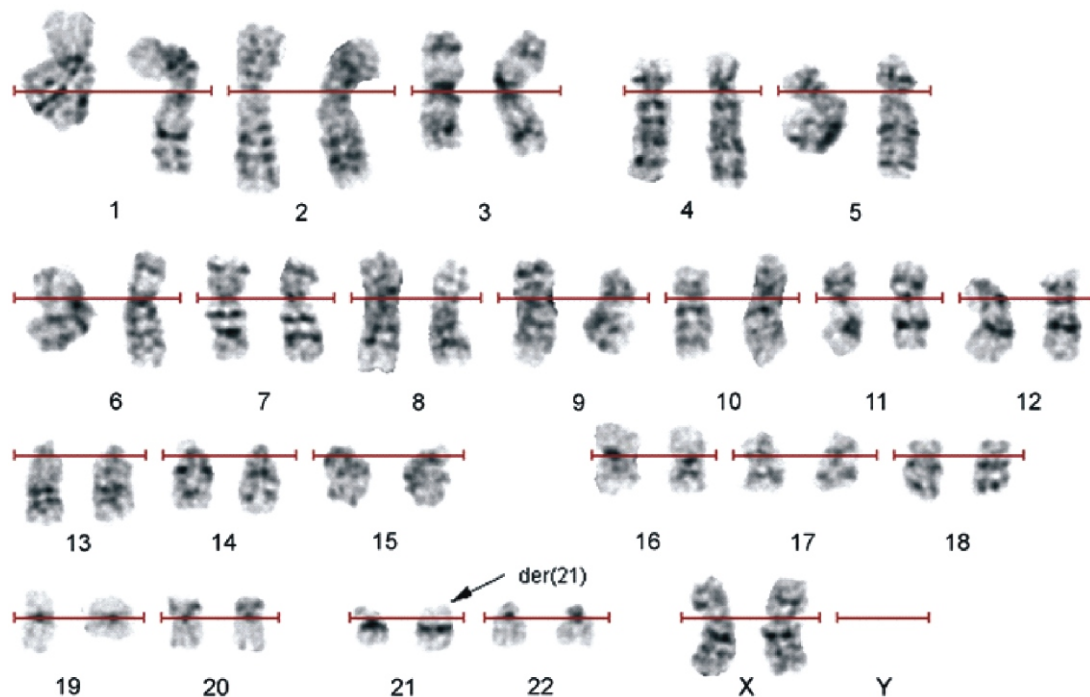


Рис. 1. GTG-дифференциальное окрашивание метафазных хромосом ворсин хориона (кариограмма).

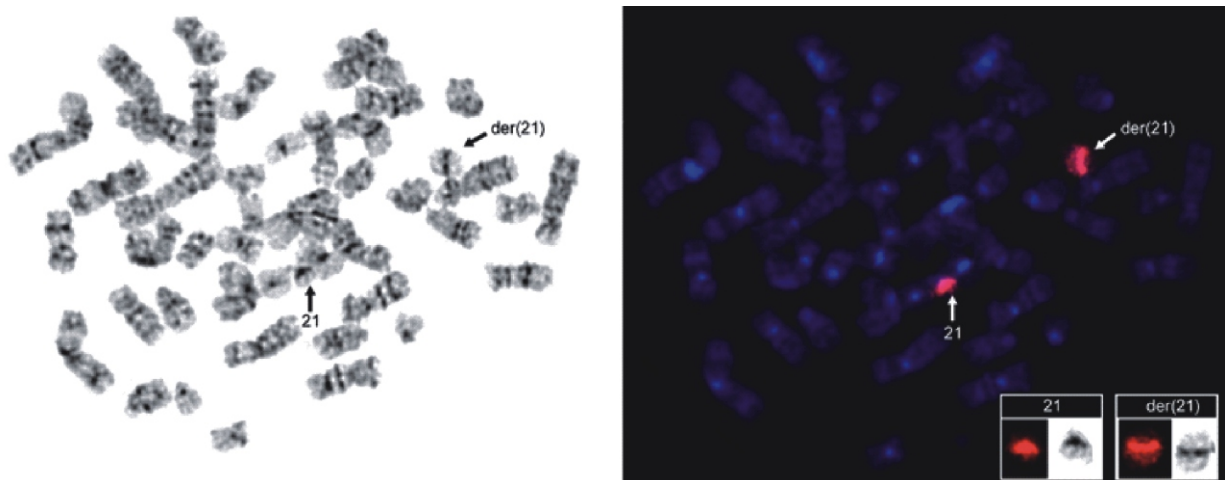


Рис. 2. FISH хромосомоспецифичной ДНК пробы Hsa21 с метафазными хромосомами ворсин хориона.

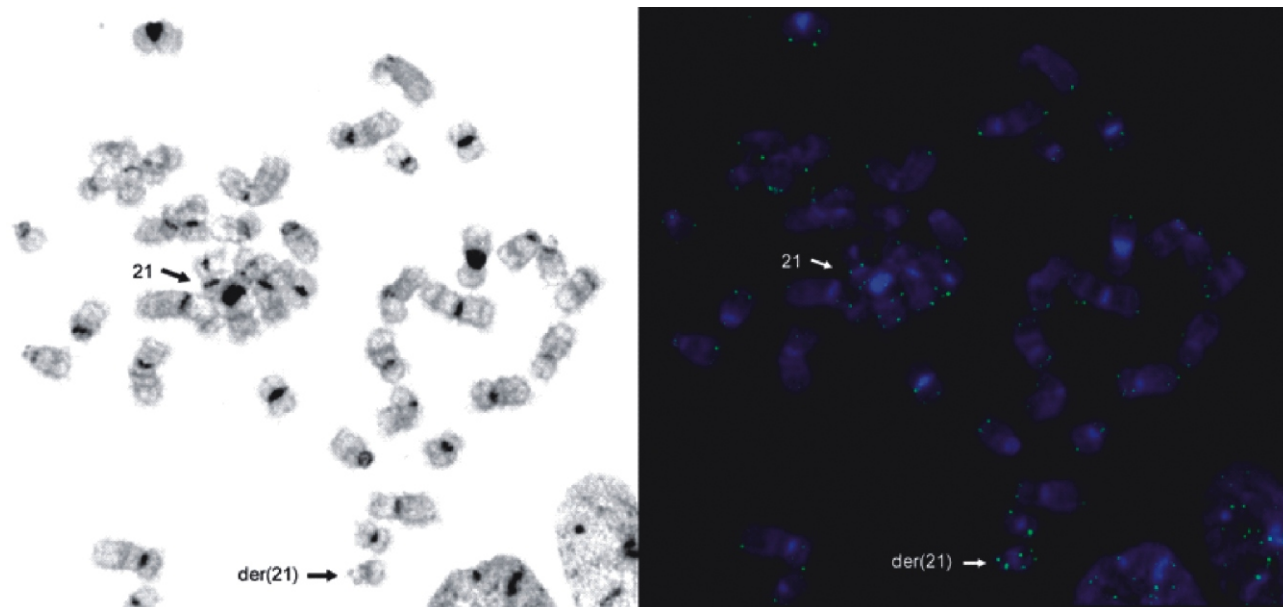


Рис. 3. FISH с использованием ДНК пробы, специфичной теломерным районам, с метафазными хромосомами ворсин хориона.

предметном стекле [14]. Условия распластывания хромосом различаются даже в пределах одной клетки, что может приводить к возникновению различий по морфологии отдельных гомологичных хромосом и значительным вариациям их размера. Так, на периферии метафазной пластинки в результате большего растяжения хромосомы часто имеют больший продольный и поперечный размер. Различия гомологичных хромосом по физическим размерам, выявляемые в отдельных метафазных пластинках, являются обычным артефактом приготовления препаратов метафазных хромосом. Однако доля метафазных пластинок, в которых наблюдаются значительные различия между гомологами конкретной хромосомы, обычно не превышает 10%. В настоящем исследовании гомологи 21-й хромосомы значительно отличались во всех метафазных пластинках, полученных из ворсинок хориона.

Стандартный паттерн дифференциального окрашивания гомологов 21-й хромосомы и FISH окрашивания ДНК-пробой, специфичной 21-й хромосоме, показали отсутствие структурных перестроек в «увеличенном» гомологе 21-й хромосомы, которые могли бы привести к наблюдаемому изменению морфологии распластанной хромосомы. Такое изменение, вероятно, является следствием нарушения процесса конденсации этой конкретной хромосомы в ходе митоза. Известно, что районы хромосом отличаются по уровню метилирования ДНК и модификации гистонов [15, 16]. Эти различия сохраняются в клеточных поколениях. Предполагается, что компактизация хромосомных районов и целых хромосом обусловлена связыванием с хроматином конденсина 1 и конденсина 2. Именно, уменьшение этих белков в хроматине метафазных хромосом может снизить сопротивляемость хромосомных районов их растяжению, и как следствие,

привести к распластыванию хромосомы на большей площади. Однако, остается вопрос, каким образом эти изменения оказались ограничены одной хромосомой. Крайне полезно было бы провести цитогенетический анализ амниотических клеток и клеток пуповинной крови плода, так как известно, что структурные и численные хромосомные перестройки могут быть ограничены клетками только части хориона [13]. К сожалению, ограниченность доступного для исследования материала не позволила провести такое исследование, как и более детальный сравнительный молекулярно-цитогенетический анализ нормального и «увеличенного» гомологов 21-й хромосомы, который бы включал иммуноокрашивание антителами специфичными к различным модификациям гистонов, метилированной ДНК, конденсина 1 и конденсина 2, негистоновым белкам (High Mobility Group: HMGB (HMG 1/2), HMGN (HMG 14/17), HMGA (HMG I(Y)) и др. [17–21].

В качестве одной из гипотез, объясняющих возникновение «увеличенного» гомолога 21-й хромосомы можно предположить амплификацию и расселение по нему некоего мобильного элемента, что может не только нарушить нормальное протекание процесса конденсации хромосом, но и привести к реальному увеличению размера этой конкретной хромосомы. В случае, если данное предположение верно, то можно также предположить, что такое расселение мобильного элемента в конкретной хромосоме имело место еще в генеративных клетках родителя, или на самых ранних стадиях эмбриогенеза. На это указывает то, что «увеличенный» гомолог 21-й хромосомы был обнаружен во всех исследованных клетках ворсинок хориона.

Нам не известно подобных случаев, описанных в литературе. Однако, мы не исключаем, что при проведении

хромосомного анализа практические цитогенетики сталкивались со сходным феноменом, но не взяли на себя смелость его описания в научной статье. Ранее мы, как и наши немецкие коллеги [17], достаточно подробно изучали процесс расплывания метафазных хромосом на предметном стекле при приготовлении цитологических препаратов и морфологическую вариативность индивидуальных хромосом в зависимости от условий приготовления препаратов и положения хромосомы в метафазной пластинке. Полученный в этих исследованиях опыт позволил нам прийти к однозначному заключению, что описанный «увеличенный» гомолог 21-й хромосомы не является техническим артефактом. Возможно, описание «увеличенного» гомолога 21-й хромосомы стимулирует более внимательное отношение к подобным случаям, что позволит провести их детальное изучение.

Список литературы

1. Милованов АП, Серова АФ. Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности (руководство для врачей). — М.: Изд-во Студия МДВ, 2011. — 216 с.
2. Баранов ВС, Кузнецова ТВ, Иващенко ТЭ и др. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней: методические рекомендации — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. — 80 с.
3. Ворсанова СГ, Юров ЮБ, Чернышов ВН. Медицинская цитогенетика. — М.: Изд-во Медпрактика-М, 2006. — 300 с.
4. Fryns JP, Petit P, Vinken L et al. Mosaic tetrasomy 21 in severe mental handicap. *Eur J Pediatr*. 1982; 139(1): 87-89.
5. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. — Berlin.: Walter de Gruyter. 2001. p. 966.
6. Баранов ВС, Кузнецова ТВ. Цитогенетика эмбрионального развития человека. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. — 640 с.
7. Рубцов НБ. Методы работы с хромосомами млекопитающих. — Новосибирск: Изд-во Новосиб. гос. ун-та. 2006. — 107 с.
8. Rubtsov N, Karamysheva T, Babochkina T et al. A new simple version of chromosome microdissection tested by probe generation for 24-multi-color FISH, Multi-color banding (MCB), ZOO-FISH and in clinical diagnostics. *Medgen*. 2000;12: 65.
9. Карамышева ТВ, Матвеева ВГ, Шорина АР, Рубцов НБ. Клинический и молекулярно-цитогенетический анализ редкого случая мозаицизма по частичной моносомии 3p и частичной трисомии 10q у человека. *Генетика*. 2001; 37 (3): 1-6.
10. Telenius H., Carter NP, Bebb CE. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by single degenerate primer. *Genomics*. 1992; 13: 718-725.
11. Lansdorp PM, Verwoerd NP, Van De Rijke FM et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet*. 1996; 5(5): 685-691.
12. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Editors Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. Basel, Switzerland: Karger, 2009.
13. Наследственные болезни: национальное руководство. Под ред. Бочков НП, Гинтер ЕК, Пузыревой ВП. — М.: Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 936 с.
14. Claussen U, Mazur A, Rubtsov N. Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet*. — 1994; 66 (2): 120-125.
15. Голышев СА, Вихревая ПН, Шеваль ЕВ и др. Роль метилирования ДНК и посттрансляционных модификаций гистонов в организации и поддержании структуры гетерохроматиновых доменов (хромосомных центров). *Цитология*. 2008; 50 (11): 972-982.
16. Козлов ВА. Метилирование ДНК клетки и патология организма. *Медицинская иммунология*. 2008; 10 (4-5).
17. Колотий АД, Юров ЮБ, Воинова ВЮ и др. Мозаицизм по моносомии хромосомы 21: необходимость использования FISH метода на различных тканях при мозаицизме низкого уровня. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; (8-2): 294-298.
18. Jiang J, Jing Y, Cost GJ et al. Translating dosage compensation to trisomy 21. *Nature*. 2013; 500 (7462): 296-300.
19. Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C et al. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21(15): 3427.
20. Saito K, Kikuchi T, Shirakawa H, Yoshida M. The stabilized structural array of two HMG1/2-boxes endowed by a linker sequence between them is requisite for the effective binding of HMG1 with DNA. *J Biochem*. 1999; 125(2): 399-405.
21. Ohndorf UM, Rould MA, He Q et al. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature*. 1999; 399(6737): 708-712.