

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕТРАПЛОИДИИ ПРИ РАННЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

© А. А. Кашеварова,¹ Н. Н. Суханова, Е. Н. Толмачева, Е. А. Саженова, И. Н. Лебедев

ГУ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН, Томск;
¹ электронный адрес: kashevarova_a@rambler.ru

С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* проведено ретроспективное исследование уровня плоидности некультивированных клеток экстраэмбриональной мезодермы и цитотрофобласта хориона 30 спонтанных абортусов человека I триместра беременности с тетраплоидным или диплоидно-тетраплоидным кариотипом, установленным в ходе стандартного цитогенетического анализа с использованием долгосрочных культур клеток этих тканей. Присутствие тетраплоидных клеток с частотой, достоверно превышающей спонтанный уровень данной геномной мутации в плацентарных тканях, подтверждено только для 43 % абортусов, что свидетельствует в пользу гипотезы о полиплоидизации фибробластов плацентарных тканей в ходе их пролиферации *in vitro*. Установлено, что преимущественная локализация тетраплоидных клеток в производных внутренней клеточной массы ассоциирована с риском формирования анэмбрионии — наиболее тяжелой формы пренатального дисморфогенеза у человека.

Ключевые слова: тетраплоидия, культуры клеток, спонтанные абортусы, интерфазная цитогенетика.

Принятые сокращения: АЭ — анэмбриония, НБ — неразвивающаяся беременность, ССА — собственно спонтанный аборт, ЦХ — цитотрофобласт хориона, ЭМ — экстраэмбриональная мезодерма, FISH — флуоресцентная *in situ*-гибридизация.

Кратное увеличение числа хромосомных наборов в клетках соматических тканей, или полиплоидия, представляет собой особую форму геномной мутации. Одна из наиболее распространенных форм полиплоидии — тетраплоидия (4n) — является существенным фактором пренатальной селекции у человека и регистрируется в среднем у 4—9 % внутриутробно погибших эмбрионов с нарушениями кариотипа (Hassold et al., 1980; Eiben et al., 1990; Griffin et al., 1997). При обобщении результатов цитогенетического скрининга 478 спонтанных абортусов I триместра беременности в томской популяции нами была отмечена чрезвычайно высокая (22.4 %) частота тетраплоидии, существенно превышающая все известные в литературе значения. При этом 87 % полиплоидных эмбрионов имели мозаичный диплоидно-тетраплоидный хромосомный набор с частотой тетраплоидного клеточного клона от 4 до 69 %. Регистрация подобного хромосомного мозаицизма при цитогенетическом анализе плацентарных тканей спонтанных абортусов традиционно рассматривается как артефакт, возникающий вследствие увеличения плоидности фибробластов в ходе их длительной пролиферации *in vitro* (Hunt, Jacobs, 1985; Rehder et al., 1989; Eiben et al., 1990). Однако вопрос о том, являются ли тетраплоидные клетки следствием процесса культивирования или они возникают *in vivo*, детерминируя гибель зародыша, до настоящего времени остается открытым. Решение данного вопроса возможно с помощью современных технологий интерфазного мо-

лекулярно-цитогенетического исследования нативных (некультивированных) клеток спонтанных абортусов, обнаруживших тетраплоидные клетки при стандартном метафазном анализе после прохождения этапа культивирования.

Целью настоящей работы явилась ретроспективная молекулярно-цитогенетическая характеристика особенностей распределения тетраплоидных клеток в нативных плацентарных тканях спонтанных абортусов человека I триместра беременности.

Материал и методика

Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Обследовано 30 спонтанных абортусов с кариотипом 4n или 4n/2n, установленным с помощью стандартного метафазного анализа культивированных клеток. Протокол проведения цитогенетического анализа подробно описан нами ранее (Nikitina et al., 2005). Продолжительность культивирования фибробластов обследованных спонтанных абортусов варьировала от 6 до 172 сут и составила в среднем 28.2 ± 6.7 сут. Продолжительность внутриутробного развития тетраплоидных зародышей варьировала от 42 до 98 сут и составила в среднем 64.8 ± 3.4 сут. Средний возраст матерей спонтанных абортусов составил $25.4 \pm$

± 6.3 года. 22 из 30 обследованных эмбрионов были получены от женщин с клиническим диагнозом неразвивающаяся беременность (НБ), поставленным в ходе динамического ультразвукового обследования и характеризующимся наличием в полости плодного мешка внутриутробно погибшего эмбриона. В 6 случаях анэмбрионии (АЭ) при ультразвуковом обследовании беременных женщин сформированных эмбриональных структур в полости плодного мешка выявлено не было. В одном случае эмбрион был получен от женщины в результате спонтанного прерывания беременности. Еще в одном случае точная информация о клиническом диагнозе отсутствовала.

В качестве контрольной группы были обследованы некультивированные клетки внезародышевых тканей 9 медицинских абортусов с нормальным кариотипом. Эмбрионы получены от здоровых женщин в возрасте 25.7 ± 9.7 года на $38.5\text{—}77.0$ -е сут беременности (в среднем 66.3 ± 3.9 сут), не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Опытная и контрольная группы абортусов не обнаруживали статистически значимых различий ни по продолжительности внутриутробного развития зародышей ($P = 0.79$), ни по возрасту матери ($P = 0.91$). Эмбриональный материал был собран за период с 1997 по 2005 г. в ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, цитогенетически обследован и хранился в банке экстраэмбриональных тканей при -70°C .

Частоту тетраплоидных клеток определяли отдельно в цитотрофобласте хориона (ЦХ) и экстраэмбриональной мезодерме (ЭМ), производных различных внезародышевых и зародышевых листков. Суспензии интерфазных ядер некультивированных клеток были получены путем ферментативной дезагрегации тканей ЭМ коллагеназой I типа и мацерации ворсин хориона в 60%-ной уксусной кислоте (Lebedev et al., 2004).

Для детекции тетраплоидии в интерфазных ядрах использовали центромероспецифичные ДНК-зонды D11Z1 и D17Z1 на хромосомы 11 и 17, меченные разными репортерными молекулами, дигоксигенин-11-дезоксидинтрифосфат и биотин-11-дезоксидинтрифосфат соответственно. Выбор данных зондов обусловлен тем, что анеуплоидия хромосом 11 и 17 регистрируется у спонтанных абортусов с низкой частотой, не превышающей 1 % от всех анеуплоидий, выявляемых у внутриутробно погибших зародышей при стандартном цитогенетическом анализе (Griffin, 1996). Это соответственно уменьшает вероятность ложной регистрации полиплоидии при увеличении числа гибридизационных сигналов в интерфазном ядре. Двухцветная гибридизация *in situ* при этом позволяет однозначно дифференцировать тетраплоидию от любых других типов числовых аномалий хромосом. С целью исключения случаев контаминации культур эмбриональных фибробластов клетками материнского происхождения нами дополнительно был проведен двухцветный интерфазный FISH-анализ некультивированных клеток 20 спонтанных абортусов женского пола с кариотипом 4n или 4n/2n с использованием центромероспецифичных ДНК-зондов на половые хромосомы DXZ1 и DYZ3.

Для синтеза ДНК-зондов использовали клоны *E. coli*, несущие плазмидную ДНК со вставками центромероспецифичных α -сателлитных последовательностей хромосом человека 11, 17, X и Y. Данные клоны были любезно предоставлены проф. М. Роччи (Resources for Molecular

Cytogenetics, Институт генетики г. Бари, Италия). Выделение плазмидной ДНК, синтез ДНК-зондов, а также интерфазный FISH-анализ были проведены по стандартной методике (Rooney, Czepulkowski, 1992).

Детекцию гибридизационных сигналов в интерфазных ядрах проводили на люминесцентном микроскопе Axioskop 50 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $1500\times$ с использованием двухполосного светофильтра. На препаратах анализировали от 200 до 1000 интерфазных ядер в каждом типе ткани у каждого спонтанного абортуса. Для определения частоты спонтанной тетраплоидии в тканях контрольной группы медицинских абортусов проводили анализ не менее чем 1000 интерфазных ядер в каждой реакции гибридизации. Принимали, что наличие восьми отдельных сигналов одинаковой интенсивности и морфологии (четыре красных — дигоксигенированный ДНК-зонд и четыре зеленых — биотинилированный ДНК-зонд) в интерфазном ядре свидетельствует о тетраплоидии (Тимошевский, Назаренко, 2005). Документирование и анализ изображения проводили с использованием программного обеспечения MacProbe, v.3.2.1 (PSI, США).

Анализ достоверности различий между частотами тетраплоидных клеток в группах медицинских и спонтанных абортусов проводили путем определения предела обнаружения аномального клеточного клона и его доверительного интервала (Lomax et al., 1994).

Предел обнаружения мутации вычисляли по формуле

$$\lim = \bar{X} + t_{(\alpha, n-1)} s \sqrt{(1+1/n)},$$

где \bar{X} — средняя пропорция тетраплоидных ядер, t — нормированное отклонение, α — уровень значимости, n — число наблюдений, s — стандартное отклонение.

95%-ный доверительный интервал (CI — confidence interval) для предела обнаружения геномной мутации определяли по формуле

$$CI = \lim \pm 1.96 \sqrt{[1 + (t_{\alpha, n-1}^2 (1+1/n)/2)] s^2 / n}.$$

На основании верхней границы доверительного интервала в анализируемой выборке интерфазных ядер спонтанных абортусов определяли ожидаемое число полиплоидных клеток. Сравнение ожидаемого и наблюдаемого чисел ядер с тетраплоидией проводили с помощью критерия χ^2 . Различия принимали достоверными при $P < 0.05$.

Реактивы. Рибонуклеаза А, пепсин, параформальдегид, формамид, Tween-20, ДНК спермы лосося, 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), авидин-флуоресцентинизотиоцианат и антидигоксигенин-родамин (Sigma, США); декстрансульфат (Pharmacia, Швеция); биотин-11-дезоксидинтрифосфат («Медиген», Россия).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы с помощью интерфазного FISH-анализа были получены контрольные данные по уровню тетраплоидии в нативных тканях медицинских абортусов с нормальным кариотипом. Частота тетраплоидии составила $0.49 \pm 0.23\%$ в ЦХ и $0.27 \pm 0.16\%$ в ЭМ. Статистически значимых различий по частоте тетраплоидных клеток в двух типах тканей нормально развиваю-

Т а б л и ц а 1

**Частота тетраплоидных клеток в нативных
экстраэмбриональных тканях спонтанных абортусов**

Номер эмбриона	Тип нарушения развития	Ткань	Частота тетраплоидных клеток, %	Превышение верхней границы предела обнаружения мутации (P)
1	АЭ	ЭМ	1.27	0.81
		ЦХ	0.30	0.01
2	НБ	»	2.15	0.48
3	—	ЭМ	75.47 ^a	<0.01
		ЦХ	76.78 ^a	<0.01
4	НБ	ЭМ	0.66	0.75
		ЦХ	0.70	0.19
5	АЭ	ЭМ	2.60 ^a	<0.01
		ЦХ	1.19	0.78
6	»	ЭМ	7.83 ^a	<0.01
		ЦХ	5.48 ^a	<0.01
7	НБ	ЭМ	0.89	0.82
8	»	ЦХ	0.00	0.02
9	ССА	»	0.30	<0.01
10	НБ	»	0.20	<0.01
11	»	ЭМ	94.52 ^a	<0.01
		ЦХ	96.35 ^a	<0.01
12	»	ЭМ	8.00 ^a	<0.01
		ЦХ	8.29 ^a	<0.01
13	»	»	0.00	0.02
14	»	ЭМ	0.47	0.56
		ЦХ	1.02	0.77
15	»	ЭМ	0.72	0.77
		ЦХ	0.80	0.54
16	»	ЭМ	0.80	0.74
		ЦХ	0.98	0.52
17	»	ЭМ	0.43	0.56
		ЦХ	0.50	0.15
18	»	ЭМ	0.50	0.50
		ЦХ	0.21	0.08
19	»	»	88.80 ^a	<0.01
20	»	»	80.60 ^a	<0.01
21	»	ЭМ	2.22 ^a	0.04
		ЦХ	0.20	<0.01
22	»	»	0.52	0.07
23	»	ЭМ	3.66 ^a	<0.01
		ЦХ	1.09	0.55
24	АЭ	ЭМ	5.03 ^a	<0.01
		ЦХ	3.19 ^a	0.01
25	»	ЭМ	95.24 ^a	<0.01
		ЦХ	0.79	0.21
26	НБ	ЭМ	2.72 ^a	<0.01
		ЦХ	2.25	0.25
27	»	ЭМ	0.40	0.18
		ЦХ	0.70	0.13
28	АЭ	ЭМ	3.20 ^a	<0.01
		ЦХ	2.81	0.06
29	НБ	»	0.20	<0.01
30	»	ЭМ	0.30	0.16
		ЦХ	1.00	0.37

^a Частоты, значимо превышающие верхнюю границу доверительного интервала.

щихся эмбрионов I триместра беременности обнаружено не было ($P = 0.73$). С учетом разрешающих возможностей интерфазного FISH-анализа были определены верхние границы предела обнаружения геномной мутации в каждом типе тканей, которые в дальнейшем были использованы в качестве критериев для оценки значимости уровня тетраплоидии в нативных тканях спонтанных абортусов. В ЦХ верхняя граница доверительного интервала составила 1.4 %, а в ЭМ — 0.99 %. Следует отметить, что в аналогичном исследовании кариотипов 30 медицинских абортусов с помощью FISH-метода и ДНК-зонда на хромосому 17 частота спонтанной тетраплоидии в плаценте составила 1.5 ± 1.1 % (Horiuchi et al., 1997). Однако в своей работе авторы не дифференцировали ЦХ и ЭМ, что не позволяет сопоставить результаты двух исследований.

На втором этапе исследования определяли количество тетраплоидных клеток в некультивированных экстраэмбриональных тканях 30 спонтанных абортусов человека с кариотипом $4n$ или $4n/2n$, установленным с помощью стандартного метафазного анализа. Количество тетраплоидных клеток, определенное FISH-методом в некультивированных тканях абортусов, варьировало от 0 до 96.3 % (в среднем 13.9 ± 5.9 %) в ЦХ и от 0.3 до 95.2 % (в среднем 14.0 ± 6.5 %) в ЭМ (табл. 1). У 28 проанализированных эмбрионов (№ 1—7, 9—12 и 14—30; табл. 1) были обнаружены два клеточных клона в одном или обоих типах внезародышевых тканей — диплоидный и тетраплоидный (см. рисунок). Однако превышение верхней границы предела обнаружения тетраплоидии было показано только для 13 абортусов, что составило 43 %.

У эмбрионов № 1, 9, 10, 21 и 29 (табл. 1) количество тетраплоидных клеток в ЦХ и ЭМ также достоверно отличалось от рассчитанного нами контрольного значения, но соответствовало нижней границе уровня спонтанной полиплоидии, которая составила 0.36 и 0.11 % соответственно. У 2 абортусов (№ 8 и 13) из 30 тетраплоидных клеток в ЦХ не было обнаружено вовсе. ЭМ у этих абортусов проанализировать не удалось, поскольку доступный для исследования материал в этих случаях был представлен исключительно ворсинами хориона и не содержал плодных оболочек мезодермального происхождения.

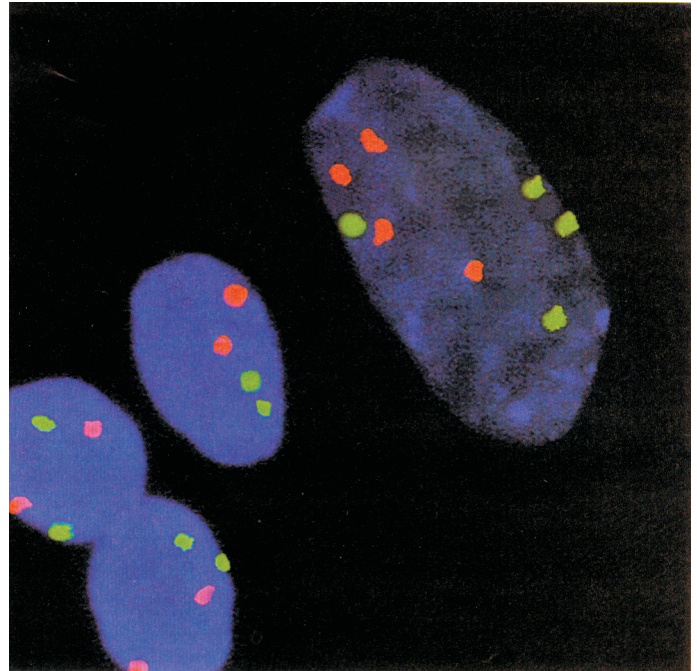
Минимальная частота подтвержденной тетраплоидии оказалась равной 3.19 % (№ 24) в ЦХ и 2.22 % (№ 21) в ЭМ. Вероятно, именно эти значения следует рассматривать как некоторый биологический пороговый уровень тетраплоидии, превышение которого имеет негативное последствие на течение эмбрионального развития человека. Наличие пороговых эффектов для различных типов хромосомных нарушений обсуждается в современной литературе (Evsikov, Verlinsky, 1998), и полученные нами данные свидетельствуют в пользу концепции существования летального порога, по крайней мере, тетраплоидных клеток. С другой стороны, максимальный уровень тетраплоидии у абортусов с не подтвержденным с помощью FISH-метода $4n$ -кариотипом составил 2.8 % (№ 28) в ЦХ и 1.3 % (№ 1) в ЭМ. Следовательно, если в нативных тканях частота аномальных клеток ниже этих значений, то при культивировании с большой вероятностью можно ожидать появления артефактной тетраплоидии.

Наконец, еще одним возможным источником регистрации артефактного кариотипа при стандартном цитогене-

нетическом анализе репродуктивных потерь является контаминация клеточных культур клетками материнского организма. Ранее нами было показано, что при описанных условиях культивирования 16 % зародышей с цитогенетически установленным кариотипом 46, XX обнаруживали ДНК Y-хромосомы в нативных тканях (Nikitina et al., 2005). Не исключено, что и материнские клетки оказываются способными к полиплоидизации *in vitro*. С целью проверки данного предположения был проведен дополнительный FISH-анализ нативных тканей 20 тетраплоидных эмбрионов женского пола (№ 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 15—18, 20—23 и 25—28; табл. 1) с центромероспецифичными ДНК-зондами на хромосомы X и Y. С использованием предложенной нами математической модели оценки эффектов материнской контаминации (Nikitina et al., 2005) было определено, что в исследуемой выборке можно ожидать наличия не менее 3 абортусов мужского пола ($20.0 \times 0.16 = 3.2$). В действительности после проведенного интерфазного FISH-анализа были выявлены 3 абортуса мужского пола (№ 2, 16 и 26; табл. 1). Еще у одного эмбриона (№ 27; табл. 1) был зарегистрирован кариотип 45, X. При этом только у одного из абортусов мужского пола (№ 26; табл. 1) частота тетраплоидных клеток превысила контрольные значения. Таким образом, не только эмбриональные, но и материнские клетки способны к полиплоидизации в условиях длительного культивирования, и этот факт следует учитывать при интерпретации результатов стандартного цитогенетического анализа репродуктивных потерь.

Возможные изменения пролиферативных свойств тетраплоидных клеток могут сказываться на соотношении нормального и аномального клеточных клонов как *in vivo*, так и *in vitro*. Этот факт имеет особое значение при проведении цитогенетического анализа ЭМ, при котором необходима инициация клеточных культур. Условия культивирования могут быть более благоприятными для одной клеточной субпопуляции, которая, таким образом, будет иметь селективное преимущество и выявляться с большей частотой при анализе цитологических препаратов. Подобное явление уже было отмечено при культивировании плацентарных тканей, когда аномальные клеточные линии преобладали над нормальными (Hunt, Jacobs, 1985). Также не исключено, что аномальная клеточная линия будет испытывать селективное давление. Более того, аномальный клон может вообще оказаться неспособным к пролиферации. При исследовании хромосомного дисбаланса в клетках спонтанных абортусов человека с низкой пролиферативной активностью *in vitro* было показано, что частота эмбрионов с тетраплоидией составила 9 % и оказалась меньшей, чем при анализе долгосрочных культур с помощью стандартного цитогенетического теста (17 %). Однако наблюдаемые различия не являлись достоверными ($P = 0.27$) (Lebedev et al., 2004). Вероятно, существует тенденция к нормальной пролиферации полиплоидных клеток в культуре, что также может свидетельствовать в пользу гипотезы об артефактном происхождении клонов тетраплоидных клеток при культивировании плацентарных тканей *in vitro*.

Так, например, было показано, что при культивировании на протяжении 100 сут плацентарных тканей кариотипически нормальных спонтанных и медицинских абортусов в культурах появились клетки с числовыми аномалиями хромосомного набора, частота которых составила 28.5 и 4.0 % соответственно (Hunt, Jacobs, 1985). Интересным кажется тот факт, что при культивировании



Диплоидно-тетраплоидный хромосомный мозаицизм в интерфазных ядрах цитотрофобласта хориона спонтанного абортуса человека.

FISH с диоксигенированным центромероспецифичным ДНК-зондом D11Z1 на хромосому 11 (красные сигналы) и биотинилированным центромероспецифичным ДНК-зондом D17Z1 на хромосому 17 (зеленые сигналы). DAPI-окраска. 1500 ×.

клеток плода в течение такого же срока хромосомных аномалий не обнаружено. Вероятно, это можно объяснить тем, что в клетках плода лучше действует система регуляции клеточного цикла, предотвращая появление аномальных клеток. Во всех культурах был отмечен $4n/2n$ -мозаицизм, однако количество $4n$ -клеток заметно варьировало в разных группах. Так, в культурах фибробластов и 83 % плацентарных тканей медицинских абортусов уровень аномального клеточного клона составил менее 10 % в течение всего процесса культивирования. Напротив, во всех внезародышевых тканях спонтанных абортусов частота тетраплоидии была выше 10 %. Таким образом, результаты данного исследования показывают значительные различия в поведении клеток плаценты и фибробластов плода в культуре *in vitro*, тогда как заключение о кариотипе эмбриона принято делать по результатам анализа именно экстраэмбриональных тканей, основываясь на предположении о том, что клетки плаценты и плода имеют одинаковый кариотип. Приведенное выше исследование ставит под сомнение возможность переноса данных кариотипирования культивированных клеток ЭМ на эмбрион. Подтверждением этому также может служить тот факт, что тетраплоидия, например, чаще регистрируется в плаценте, чем в тканях плода (Toth et al., 1992).

Вследствие того что Хант и Якобс (Hunt, Jacobs, 1985) не обнаружили корреляции между увеличением менструального срока беременности и частотой аномальных клеточных клонов в культурах плацентарных тканей, они предположили, что эти аномалии появились в результате культивирования. Таким образом, плацентарные ткани, вероятно, имеют предрасположенность к форми-

Таблица 2
Частота тетраплоидии при анэмбрионии
и неразвивающейся беременности^а

Литературный источник	Тип нарушения развития	
	АЭ	НБ
Ohno et al., 1991	2.1	0.0
Kalousek, 1993	14.0	—
Minelli et al., 1993	8.6	0.0
Brajenovic-Milic et al., 1998	7.1	5.6
Sanchez et al., 1999	—	1.9
Настоящее исследование	14.1	3.2
Всего:	9.2 ± 2.3	2.1 ± 1.1

^а Частоты приведены в % от всех выявленных нарушений кариотипа.

рованию аномальных клеточных клонов *in vitro*. Это предположение получает все больше подтверждений в современной литературе. В частности, показано, что от 20 до 60 % интерфазных клеток ЦХ нормальных зародышей человека демонстрируют анеуплоидию хромосом 16, X и Y, а в некоторых популяциях трофобласта частота гипердиплоидных клеток может достигать 95 % (Weiger et al., 2005). Авторами данной работы была высказана гипотеза о том, что в основе наблюдаемого феномена лежит способность клеток ЦХ инактивировать клеточный цикл на определенных этапах дифференцировки, что приводит к формированию особого анеуплоидного опухолевого фенотипа, обеспечивающего способность трофобласта к инвазии в ткани матки.

В то же время были обнаружены значительные различия в результатах культивирования клеток спонтанных и медицинских абортусов (Hunt, Jacobs, 1985). Около 50 % кариотипически нормальных культур спонтанных абортусов демонстрировали появление аномальных клеточных клонов, тогда как среди медицинских абортусов этот показатель составил только 4 %. Кроме того, полиплоидизация была более выражена в культуре плацентарных тканей именно спонтанных абортусов (Hunt, Jacobs, 1985). Таким образом, проблема определения порогового уровня тетраплоидии в тканях человека и формирующих его механизмов остается актуальной задачей в области современной генетики развития. Не исключено, что в основе молекулярных механизмов формирования и негативных фенотипических эффектов тетраплоидных клеток лежат нарушения недавно описанной «тетраплоидной сверочной точки клеточного цикла» — «G1 tetraploidy checkpoint» (Margolis et al., 2003; Storchova, Pellman, 2004).

Особый интерес представляет анализ распределения хромосомных аномалий в производных различных зародышевых листков как одной из причин ранней эмбриональной гибели. Для 11 из 13 абортусов с подтвержденным тетраплоидным кариотипом были проанализированы ЦХ и ЭМ. У 7 зародышей (64 %) полиплоидные клетки с близкой частотой обнаружены в производных различных зародышевых листков. Для 4 эмбрионов — 36 % (№21, 23—25; табл. 1) — были выявлены межтканевые различия по локализации тетраплоидных клеток с достоверным преобладанием их в ЭМ по сравнению с ЦХ. ЭМ является производной эпибласта, возникающего из внутренней клеточной массы бластоцисты и диффе-

ренцирующегося как во все ткани зародыша, так и в некоторые экстраэмбриональные производные (амнион, желточный мешок, мезодерма хориона). Наблюдаемое межтканевое распределение клеток с аномальным кариотипом при частоте тетраплоидии в ЦХ ниже верхней границы предела ее обнаружения указывает на возникновение геномной мутации уже после обособления внутренней клеточной массы. У одного абортуса частота полиплоидных клеток в ЦХ оказалась выше порогового уровня, что позволяет предположить образование аномального клеточного клона еще на доимплантационном этапе.

Возможно, что преимущественная локализация тетраплоидных клеток в производных внутренней клеточной массы может выступать дополнительным фактором пренатального отбора. Предполагается, что в эмбриональных тканях млекопитающих против клеток с геномной мутацией действует негативная селекция, один из возможных путей которой заключается в преимущественной локализации аномальных клеток в трофэктодерме (Tarkowski et al., 1977; James et al., 1995; Everett, West, 1998; Goto et al., 2002). Это предположение находит подтверждение в экспериментах с химерами мышей, содержащими равное количество диплоидных и тетраплоидных бластомеров, одинаковых по размеру (Tang et al., 2000). В этих химерах большая часть тетраплоидных клеток располагалась в трофэктодерме, а не во внутренней клеточной массе. Кроме того, при получении химер из равного количества диплоидных бластомеров разного размера было показано, что более крупные бластомеры располагаются с внешней стороны бластоцисты. Аналогичного расположения клеток следует ожидать и при тетраплоидном кариотипе, который, как правило, сопровождается увеличением клеточного объема.

Таким образом, больший размер клеток и большая плоидность их генома способствуют случайному распределению тетраплоидных клеток между зародышевыми и внезародышевыми тканями. Например, было показано, что мозаичные эмбрионы свиней могут развиваться до плода только в том случае, если полиплоидные клетки входят в состав трофобласта и участвуют в формировании экстраэмбриональных структур (Han et al., 1999). В то же время при исследовании кариотипа 5 бластоцист человека, полученных в ходе процедуры экстракорпорального оплодотворения и исключенных для имплантации по причине морфологических нарушений, с помощью FISH-анализа было показано, что тетраплоидные клетки во внутренней клеточной массе встречаются примерно в 2.8 раза чаще, чем в трофэктодерме (Derhaag et al., 2003). Это наблюдение авторы работы объяснили более высоким пролиферативным индексом клеток внутренней клеточной массы по сравнению с трофэктодермой на 5—6-е сут эмбрионального развития. Также не исключено, что тетраплоидные клетки менее компетентны к дифференцировке в специализированные типы (Goto et al., 2002), поэтому их накопление во внутренней клеточной массе будет иметь более выраженный негативный эффект.

С целью изучения влияния распределения тетраплоидных клеток в производных трофобласта и внутренней клеточной массы на характер нарушения эмбрионального развития человека спонтанные абортусы в настоящем исследовании были разделены на две группы — АЭ и НБ. В 5 из 6 случаев АЭ (83 %) (№ 5, 6, 24, 25 и 28; табл. 1) тетраплоидный кариотип был подтвержден с по-

мощью FISH-анализа. В группе НБ (22 эмбриона) тетраплоидными оказались только 7 (32 %). Основываясь на собственных результатах и данных литературы (табл. 2), можно предположить, что преимущественная локализация тетраплоидных клеток в производных внутренней клеточной массы выступает фактором риска развития наиболее тяжелой формы дисморфогенеза — АЭ.

Таким образом, в ходе настоящей работы было показано, что не все тетраплоидные кариотипы спонтанных абортусов, установленные с использованием методов классической цитогенетики, можно считать истинно тетраплоидными вследствие эффектов увеличения плоидности клеток в условиях длительного культивирования плацентарных тканей. Результаты проведенного ретроспективного анализа нативных тканей показывают, что частота тетраплоидии среди спонтанных абортусов с нарушениями кариотипа в обследованной нами томской популяции снизилась с 22.4 до 9.6 %, что хорошо согласуется с результатами исследований цитогенетических факторов пренатального отбора у человека (Eiben et al., 1990; Kalousek et al., 1993; Griffin et al., 1997).

Авторы выражают благодарность врачам Генетической клиники ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН М. О. Филипповой и М. П. Корф за помощь в сборе материала для настоящего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48129).

Список литературы

- Тимошевский В. А., Назаренко С. А. 2005. Критерии оценки частоты анеуплоидии в интерфазных ядрах клеток с помощью FISH-анализа. Цитология. 47 (6) : 526—532.
- Brajenovic-Milic B., Petrovic O., Krasevic M., Ristic S., Kapovic M. 1998. Chromosomal anomalies in abnormal human pregnancies. Fetal Diagn. Therapy. 13 : 187—191.
- Derhaag J. G., Coonen E., Bras M. 2003. Chromosomally abnormal cells are not selected for the extra-embryonic compartment of the human preimplantation embryo at the blastocyst stage. Hum. Reprod. 18 : 2565—2575.
- Eiben B., Bartels I., Bahr-Porsch S. 1990. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. Amer. J. Hum. Genet. 47 : 656—663.
- Everett C. A., West J. D. 1998. Evidence for selection against tetraploid cells in tetraploid \leftrightarrow diploid mouse chimaeras before the late blastocyst stage. Genet. Res. Camb. 72 : 225—228.
- Evsikov S., Verlinsky Y. 1998. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. Hum. Reprod. 13 : 3151—3155.
- Goto Y., Matsui J., Takagi N. 2002. Developmental potential of mouse tetraploid cells in diploid \leftrightarrow tetraploid chimeric embryos. Int. J. Develop. Biol. 46 : 741—745.
- Griffin D. K. 1996. The incidence, origin and etiology of aneuploidy. Int. Rev. Cytol. 167 : 263—296.
- Griffin D. K., Millie E. A., Redline R. W. 1997. Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism. Amer. J. Med. Genet. 72 : 297—301.
- Han Y. M., Wang W. H., Abeydeera L. R., Petersen A. L., Kim J. H., Murphy C., Day B. N., Prather R. S. 1999. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. Biol. Reprod. 61 : 1340—1346.
- Hassold T. A., Chen N., Funkhouser J. 1980. Cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann. Hum. Genet. 44 : 151—178.
- Horiuchi I., Hashimoto T., Tsuji Y., Shimada H., Furuyama J., Koyama K. 1997. Direct assessment of triploid cells in mosaic human fetuses by fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Hum. Reprod. 3 : 445—450.
- Hunt P. A., Jacobs P. A. 1985. *In vitro* growth and chromosome constitution of placental cells. Cytogenet. Cell Genet. 39 : 1—6.
- James R. M., Klerkx A. H., Keighren M., Flockhart J. H., West J. D. 1995. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid \leftrightarrow diploid chimeras. Develop. Biol. 167 : 213—226.
- Kalousek D. K. 1993. Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3912 cases. Birth Defects Orig. Artic. Ser. 29 : 53—61.
- Lebedev I. N., Ostroverkhova N. V., Nikitina T. V., Sukhanova N. N., Nazarenko S. A. 2004. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. Eur. J. Hum. Genet. 12 : 513—520.
- Lomax B. L., Kalousek D. K., Kuchinca B. D., Barrett I. J., Harrison K. J., Safavi H. 1994. The utilization of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism. Hum. Genet. 93 : 243—247.
- Margolis R. L., Lohez O. D., Andreassen P. R. 2003. G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. J. Cell. Biochem. 88 : 673—683.
- Minelli E., Buchi C., Granata P., Meroni E., Righi R., Portentos P., Giudici A., Ercoli A., Sartor M. G., Rossi A. 1993. Cytogenetic findings in echographically defined blighted ovum abortions. Ann. Genet. 36 : 107—110.
- Nikitina T. V., Lebedev I. N., Sukhanova N. N., Sazhenova E. A., Nazarenko S. A. 2005. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors. Fertil. Steril. 83 : 964—972.
- Ohno M., Maeda T., Matsunobi A. 1991. A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. Obstet. Gynecol. 77 : 394—398.
- Rehder H., Coerdts W., Eggert R., Klink F., Schwinger E. 1989. Is there a correlation between morphological and cytogenetic findings in placental tissue from early missed abortions? Hum. Genet. 82 : 377—385.
- Rooney D. E., Czepulkowski B. H. 1992. Human cytogenetics. A practical approach. New York: Oxford Univ. Press. 1 : 274 p.
- Sanchez J. M., Franzi L., Collija F., De Diaz S. L., Panal M., Dubner M. 1999. Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi. Prenat. Diagn. 19 : 601—603.
- Storchova Z., Pellman D. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 45—54.
- Tang P. C., Ritchie W. A., Wilmut I., West J. D. 2000. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts. Zygote. 8 : 33—43.
- Tarkowski A. K., Witkowska A., Opas J. 1977. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid \leftrightarrow tetraploid mosaic mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 41 : 47—64.
- Toth A., Arato G., Szepesi J., Hajdu K., Szigetvary I., Laszlo J. 1992. Tetraploidy in human placenta. A dilemma in molar and non-molar pregnancies. Gynecol. Obstet. Invest. 33 : 153—156.
- Weier J. F., Weier H. G., Jung C. J., Gormley M., Zhou Y., Chu L. W., Genbacev O., Wright A. A., Fisher S. J. 2005. Human cytotrophoblasts acquire aneuploidies as they differentiate to an invasive phenotype. Develop. Biol. 279 : 420—432.

RETROSPECTIVE MOLECULAR-CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF TETRAPLOIDY
IN EARLY EMBRYOLETHALITY OF MAN*A. A. Kashevarova,¹ N. N. Sukhanova, E. N. Tolmacheva, E. A. Sazhenova, I. N. Lebedev*

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk Research Center of Siberian Branch RAMS, Tomsk;

¹ e-mail: kashevarova_a@rambler.ru

The ploidy level of noncultivated extraembryonic tissues was studied by fluorescence *in situ* hybridization in 30 human I trimester spontaneous abortions with tetraploid or diploid-tetraploid karyotype after conventional cytogenetic analysis. Only thirteen embryos (43 %) were verified to be tetraploid that provides evidence for the hypothesis of placental cell polyploidization during long-term *in vitro* cultivation. It is shown that preferred compartmentalization of tetraploid cells in the inner cell mass derivatives is associated with blighted ovum — the most severe type of human embryo dysmorphogenesis.

Key words: tetraploidy, long-term cell cultures, spontaneous abortions, interphase cytogenetics.
