

ЧАСТОТА СПОНТАННОЙ АНЕУПЛОИДИИ В КЛЕТКАХ КРОВИ ФЕРТИЛЬНЫХ ЖЕНЩИН

© Н. В. Зотова,¹ Е. В. Маркова,¹ И. Н. Лебедев,² А. В. Светлаков¹

¹ Центр репродуктивной медицины, Красноярск; электронный адрес: krasivf@kcrtm.ru;

² Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра РАН; электронный адрес: igor.lebedev@medgenetics.ru

Представлены результаты молекулярно-цитогенетического исследования клеток крови фертильных женщин репродуктивного возраста. Для анализа использованы культивированные и некультивированные клетки и два комплекта ДНК-зондов с прямым и непрямым мечением. Определены средние уровни анеуплоидии по четырем хромосомам и рассчитаны предельные значения анеуплоидии. Для культивированных лимфоцитов, исследованных с помощью FISH-анализа с прямым мечением, уровень анеуплоидии для отдельных хромосомных нарушений варьировал от 0.1 до 1.3 %, средний уровень по всем исследованным хромосомам (13, 18, 21 и X) составил 1.39 %, предел выявления мутации — 3.4 %. Выявлены различия результатов, получаемых с использованием ДНК-зондов с прямым и непрямым мечением. Показано, что процесс культивирования клеток оказывает определенное влияние на частоту анеуплоидии. Абсолютная ошибка метода FISH с прямым мечением составила 0.13 %, относительная — 4.08 %.

Ключевые слова: частота спонтанной анеуплоидии, точность метода FISH.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) находит все большее применение в диагностике и мониторинге уровня анеуплоидии. Возможность применения коммерческих хромосомспецифичных ДНК-зондов делает метод FISH доступной техникой для клинических цитогенетических лабораторий. Метод может быть эффективно использован при оценке минимального гипер- или гипоплоидного клона, для выявления низкоуровневого или скрытого мозаицизма (Clementini et al., 2005; Papanikolaou et al., 2005; Шилова, Золотухина, 2007). Особую актуальность приобретает данный вопрос в области репродуктивной цитогенетики, где случаи гоносомного мозаицизма нередки (Ворсанова и др., 1998; Зерова и др., 2005; Lenz et al., 2005).

Анеуплоидии возникают при нарушении сегрегации реплицированных хромосом между двумя дочерними клетками. Установлен целый ряд молекулярных механизмов, индуцирующих анеуплоидии (Fenech, 2002; Leach et al., 2004; Iarmarcovai et al., 2006). Показано, что уровень анеуплоидии в клетках крови может увеличиваться спонтанно или под влиянием химических агентов внешней среды. Имеются отдельные сообщения о связи приема лекарств (анальгетиков, антибиотиков), оральных контрацептивов и спермицидов с повышением уровня анеуплоидии (Aardema et al., 1998). Также риск хромосомных нарушений увеличивается с возрастом (Тимошевский и др., 2006), при лимфомах и после перенесенных заболеваний вирусным гепатитом С (Goldberg-Bittman et al., 2008).

В ряде исследований показано, что сам процесс культивирования клеток в питательной среде является причиной повышения уровня анеуплоидии (Richard et al., 1993; Назаренко и др., 1997).

При исследовании анеуплоидии низкого уровня ложноположительная диагностика моносомии и трисомии может являться результатом методических артефактов, таких как неспецифическое связывание зонда с ДНК, неоптимальные условия гибридизации или детекции гибридационных сигналов, использование недостаточно строгих критериев подсчета сигналов (Lomax et al., 1994). Очевидно, что предел выявления анеуплоидии в клетках крови может зависеть и от типа используемых ДНК-зондов.

При оценке уровня анеуплоидии, выявляемого с помощью метода FISH, необходимы показатели нормы, опирающиеся в том числе и на сведения об ошибке данного метода. Целью работы явилось исследование уровня анеуплоидии в клетках крови здоровых фертильных женщин для выявления пределов обнаружения анеуплоидии по нескольким хромосомам для определения показателей нормы. Проведена попытка сравнения результатов FISH-анализов с применением ДНК-зондов с прямым и непрямым мечением, культивированных и некультивированных клеток и определения ошибки FISH-метода. Использованы зонды на хромосомы X (наиболее часто вовлеченная в мозаицизм низкого уровня хромосома), 18, 13 и 21 (хромосомы, имеющие повышенный уровень анеуплоидии среди аутосом и наиболее часто используемые для диагностики клинически значимых анеуплоидий). Прямое мечение основано на использовании ДНК-зондов, в которых определенные нуклеотиды непосредственно связаны с флуоресцентной меткой. При непрямом мечении нуклеотиды связаны с репортерными молекулами (биотин, дигоксигенин), которые выявляются на дополнительном этапе иммунохимической детекции.

Материал и методика

Исследуемую группу составили 12 фертильных женщин (средний возраст 30.5 ± 0.81 года), отобранных согласно требованиям приказа Министерства здравоохранения, предъявляемым к донорам ооцитов: возраст от 20 до 35 лет, наличие собственного здорового ребенка, отсутствие выраженных фенотипических отклонений, соматическое здоровье. Забор крови производили в пробирку Vacuette с Li-гепарином.

Стандартный хромосомный анализ проводили на препаратах метафазных хромосом, полученных после культивирования ФГА-стимулированных лимфоцитов в течение 72 ч. Для дифференциального окрашивания использовали GTG-метод. Анализировали 12 метафазных пластинок (Roney, 2001). Для получения изображения метафаз и анализа кариограмм использовали программный продукт Band View (Applied Spectral Imaging, США). Все обследованные имели нормальный женский кариотип.

Суспензии культивированных лейкоцитов использовали для FISH-анализа. Для анализа анеуплоидии в некультивированных клетках выделяли фракцию лейкоцитов крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина (Маца, 1990). Фиксацию клеток проводили стандартно в одинаковых условиях для культивированных и некультивированных клеток. Один из образцов культивировали в пяти повторностях для анализа ошибки метода.

FISH-анализ проводили как на некультивированных, так и на культивированных клетках. Для некультивированных клеток проводили их дополнительную протеолитическую обработку с использованием растворов пепсина или трипсина. Использовали два комплекта флуоресцентных ДНК-зондов: смесь зондов с прямым мечением Multi-Vysion PGT (Abbott Molecular Inc., США), включающую в себя CEP 18 — Spectrum Aqua, CEP X — Spectrum Blue, LSI 13 — Spectrum Red, LSI 21 — Spectrum Green и центромероспецифические зонды с непрямым мечением репортерными молекулами — дигоксигенином-11-dUTP (DXZ1) и биотином-16-dUTP (D18Z1), любезно предоставленные лабораторией цитогенетики ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН (Томск), с последующей иммунохимической детекцией с авидин-ФИТЦ (Sigma, Германия) и антидигоксигенин-родамином (Boehringer Mannheim, Германия). Гибридизацию осуществляли в течение 14–16 ч при 37 °С. Гибридизацию и постгибридизационную отмывку прямых зондов выполняли согласно инструкциям фирмы-производителя. Иммунохимическую детекцию зондов с непрямым мечением проводили в соответствии с методическими рекомендациями (Тимошевский и др., 2006).

Подсчет гибридных сигналов на препаратах с растворами DAPI и Vectashield проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX 51 при 600-кратном увеличении с использованием соответствующего набора светофильтров. Для получения и анализа изображения использовали программу FISH View (Applied Spectral Imaging, США). В каждом случае анализировали 1000 ядер. Эффективность гибридизации оценивали по наличию не менее 85 % клеток, содержащих сигнал (Beatty et al., 2002). Для каждой клетки сигналы всех хромосом подсчитывали одновременно.

При подсчете сигналов использовали критерии, обобщенные по данным литературы с некоторой модификацией (Munne et al., 1998; Beatty et al., 2002; Тимошевский

и др., 2006): 1) отдельные сигналы типичного размера и яркости интерпретировали как присутствие соответствующего числа копий хромосом; 2) гибридационные сигналы проверяли на других светофильтрах; при их обнаружении на всех фильтрах сигналы расценивали как неспецифические; 3) если наблюдался один сигнал на клетку, но его интенсивность свечения была в 2 раза больше, его трактовали как наложение двух сигналов, находящихся в разных плоскостях; проверку осуществляли вращением микровинта (анализ сигналов в разных плоскостях); 4) два рядом расположенных сигнала интерпретировали как разные хромосомы, если между ними можно было поместить один сигнал такого же размера; 5) при наличии в ядре одного нормального сигнала, а второго удвоенного (2 близкорасположенные метки) результат трактовали как вариант нормы; 6) при наличии в ядре одного удвоенного сигнала результат также трактовали как вариант нормы; 7) моносомии по всем хромосомам проверяли на каждом индивидуальном светофильтре для избегания наложений сигналов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 7.0. Рассчитывали средние значения (\bar{x}) и ошибки средних (m), минимума (\min) и максимумы (\max). Достоверность различий между средними значениями определяли непараметрическим критерием Вилкоксона. Предел обнаружения мутации (\lim) и 95%-ный доверительный интервал (CI — confidence interval) определяли по формуле (Lomax et al., 1994), используемой в отечественных молекулярно-цитогенетических исследованиях (Назаренко и др., 1997; Назаренко, Тимошевский, 2004).

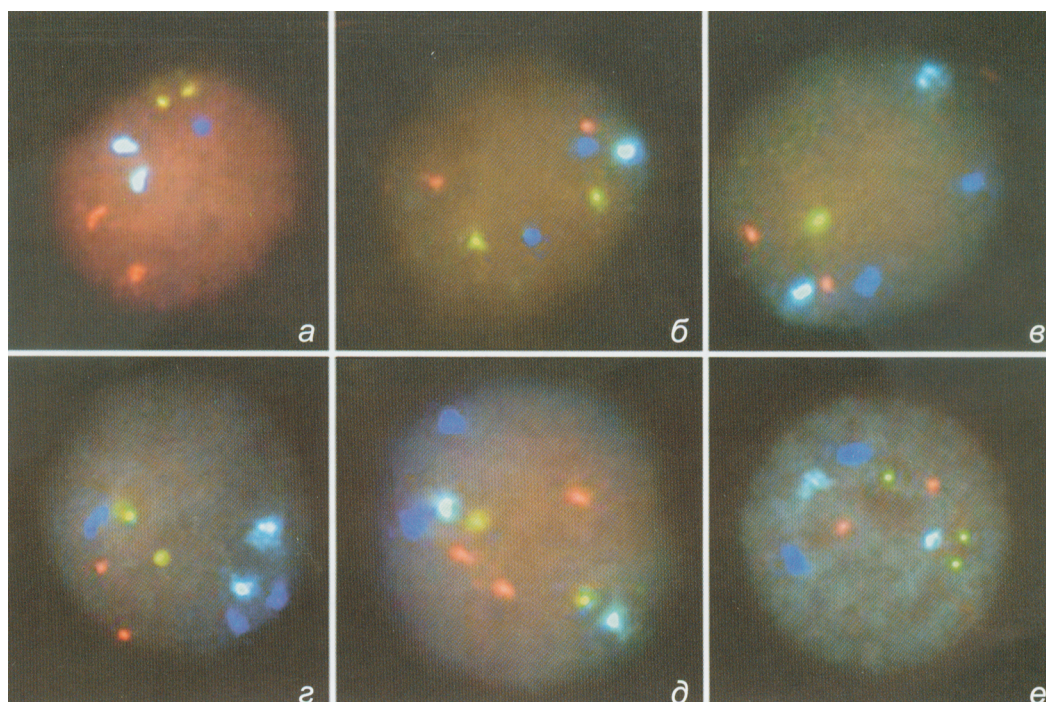
Абсолютную ошибку метода рассчитывали как ошибку средней арифметической величины при анализе повторностей одного образца. Относительную ошибку метода рассчитывали как долю (в %) абсолютной ошибки от среднего значения.

Результаты

Анализ уровня анеуплоидии в клетках крови проводили на культивированных и некультивированных клетках 12 пациенток с применением двух типов ДНК-зондов. Всего проанализировано 48 000 клеток. Гипер- и гиподиплоидные сигналы выявляли в интерфазных клетках крови во всех обследованных образцах. Хромосомные нарушения представляли собой моносомии и трисомии. Нуллисомии хромосом в нашем исследовании зафиксированы не были. Примеры FISH-изображений анеуплоидных ядер культивированных и некультивированных клеток, полученные с использованием ДНК-зондов с прямым мечением, представлены на рисунке.

Средняя частота анеуплоидии в клетках крови и предел выявления анеуплоидии с соответствующим 95%-ным доверительным интервалом для исследованных образцов приведены в табл. 1.

Полученные результаты FISH-анализа с ДНК-зондами с прямым мечением свидетельствуют о том, что в некультивированных клетках частота моносомии варьировала от 0.1 до 0.7 % по разным аутосомам, трисомии — от 0.1 до 0.6 %, а в культивированных клетках диапазоны варьирования составили 0.1–0.5 и 0.1–1.3 % соответственно. Не установлено превышения частоты гипо- и гиперплоидии по X-хромосоме по сравнению с исследованными аутосомами.



Примеры анеуплоидных интерфазных ядер лейкоцитов, выявляемых методом FISH.

a—в — моносомии хромосом (соответственно X; 18; 21); *г—е* — трисомии хромосом (соответственно X; 13; 21) (голубой сигнал — хромосома 18, синий сигнал — хромосома X, красный сигнал — хромосома 13, зеленый сигнал — хромосома 21).

Т а б л и ц а 1

Частота анеуплоидии (%) по хромосомам 13, 18, 21 и X в культивированных и некультивированных клетках крови

Аномальные клетки	Прямые зонды		Непрямые зонды	
	некультивированные клетки, <i>n</i> = 12 000	культивированные клетки, <i>n</i> = 12 000	некультивированные клетки, <i>n</i> = 12 000	культивированные клетки, <i>n</i> = 12 000
Моносомия X	0.17 ± 0.03	0.27 ± 0.08	0.57 ± 0.15	0.34 ± 0.06
	0.10—0.40	0.10—1.00	0.10—2.10	0.10—0.70
	0.40 ± 0.11	0.92 ± 0.30	1.77 ± 0.57	0.85 ± 0.24
Трисомия X	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.51 ± 0.06
	0.10—0.20	0.10—0.40	0.10—0.40	0.20—1.00
	0.19 ± 0.03	0.41 ± 0.11	0.52 ± 0.13	1.01 ± 0.24
Моносомия 13	0.35 ± 0.05	0.17 ± 0.05	Нет данных	Нет данных
	0.10—0.70	0.10—0.47		
	0.73 ± 0.18	0.47 ± 0.14		
Трисомия 13	0.33 ± 0.04	0.54 ± 0.11	» »	» »
	0.10—0.60	0.20—1.30		
	0.64 ± 0.15	1.40 ± 0.40		
Моносомия 18	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.06	» »	0.48 ± 0.08
	0.10—0.30	0.10—0.50		0.20—1.00
	0.34 ± 0.07	0.59 ± 0.18		1.08 ± 0.28
Трисомия 18	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.04	» »	0.38 ± 0.06
	0.10—0.20	0.10—0.40		0.10—0.07
	0.24 ± 0.05	0.41 ± 0.11		0.87 ± 0.23
Моносомия 21	0.13 ± 0.02	0.23 ± 0.05	» »	Нет данных
	0.10—0.20	0.10—0.50		
	0.23 ± 0.05	0.54 ± 0.15		

Таблица 1 (продолжение)

Аномальные клетки	Прямые зонды		Непрямые зонды	
	некультивированные клетки, $n = 12\ 000$	культивированные клетки, $n = 12\ 000$	некультивированные клетки, $n = 12\ 000$	культивированные клетки, $n = 12\ 000$
Трисомия 21	0.14 ± 0.03 0.10—0.30 0.32 ± 0.09	0.18 ± 0.04 0.10—0.50 0.49 ± 0.14	Нет данных	Нет данных
Двойная трисомия 13, 21	—	0.01 ± 0.00	» »	» »
Суммарная анеуплоидия	1.13 ± 0.08 0.50—1.60 1.80 ± 0.32	1.66 ± 0.22 0.60—3.47 3.40 ± 0.82	» »	1.71 ± 0.13 1.00—2.60 0.73 ± 0.48
Суммарная анеуплоидия по X-хромосоме	0.22 ± 0.04 0.10—0.50 0.65 ± 0.14	0.40 ± 0.09 0.10—1.10 1.13 ± 0.34	0.82 ± 0.15 0.30—2.30 1.98 ± 0.55	0.85 ± 0.09 0.40—1.30 1.55 ± 0.33

Примечание. В ячейках приводятся средние и их ошибки — первая строка, минимумы и максимумы — вторая строка, пределы обнаружения мутации и 95%-ный доверительный интервал — третья строка.

Суммарная частота анеуплоидии по отдельным хромосомам не превысила 1 %. В исследовании с зондами с прямым мечением суммарная частота анеуплоидии по четырем хромосомам (13, 18, 21 и X) для культивированных клеток составила 1.7 %. Выявленная с использованием зондов с непрямым мечением частота анеуплоидии по двум хромосомам (18 и X) составила 1.7 %. Обнаружено, что частота X-анеуплоидии, определяемая зондами с непрямым мечением, в 2.1 раза выше в культивированных клетках ($P = 0.026$) и в 3.7 раза выше в некультивированных ($P = 0.002$) в сравнении с аналогичными параметрами, полученными при использовании зондов с прямым мечением. Увеличение происходило за счет как трисомии, так и моносомии.

Установлен эффект повышения частоты анеуплоидии после культивирования клеток при исследовании с использованием зондов с прямым мечением. Выявлено увеличение суммарного уровня анеуплоидии в 1.5 раза по четырем хромосомам после культивирования, детектированного прямым мечением ($P = 0.041$). По отдельным хромосомам, за исключением 13-й, значимых различий между культивированными и некультивированными

клетками не выявлено. Обнаружено, что достоверно уменьшился уровень моносомии по 13-й хромосоме ($P = 0.028$). В исследовании с зондами с непрямым мечением эффект культивирования зафиксирован только для трисомии X ($P = 0.001$).

Рассчитанные нами предельные значения для каждого хромосомного нарушения для некультивированных клеток при FISH-анализе с прямым мечением составляют от 0.19 до 0.73 % по аутосомам. Так же как и средние уровни, более высокие предельные значения анеуплоидии по хромосомам X и 18 установлены при использовании FISH-зондов с непрямым мечением. Предел выявления трисомии по X-хромосоме был выше в культивированных клетках: 0.41 % при прямом мечении и 1.01 % при непрямым по сравнению с некультивированными (0.19 и 0.52 % соответственно). Суммарный предел выявления мутаций в культивированных клетках по четырем хромосомам с прямым мечением составил 3.4 %, а с учетом 95%-ного доверительного интервала верхнее значение предела составило 4.22 %.

С целью выявления ошибки метода FISH, которую необходимо учитывать при определении низкого уровня

Таблица 2

Частота спонтанной анеуплоидии в лимфоцитах одного и того же образца периферической крови в пяти повторностях по данным мультицветного FISH-анализа

Тип анеуплоидии	Частота					$\bar{x} \pm m$
	1	2	3	4	5	
Моносомия X	0.80	0.90	1.00	0.90	0.90	0.90 ± 0.03
Трисомия X	0.60	0.30	0.20	0.60	0.30	0.40 ± 0.08
Моносомия 13	0.30	0.30	0.10	—	0.30	0.20 ± 0.06
Трисомия 13	0.30	0.40	0.70	0.50	0.30	0.44 ± 0.07
Моносомия 18	0.60	0.60	0.60	0.30	0.40	0.50 ± 0.06
Трисомия 18	0.20	0.10	0.10	0.10	—	0.10 ± 0.03
Моносомия 21	0.30	0.60	0.30	0.20	0.30	0.34 ± 0.07
Трисомия 21	0.10	0.40	0.30	0.30	0.40	0.30 ± 0.05
Суммарная анеуплоидия	3.20	3.60	3.30	2.90	2.90	3.18 ± 0.13

анеуплоидии, был проведен эксперимент с пятью повторностями одного образца крови, разделенного на пять аликвот, которые культивировали отдельно (табл. 2). Для этого из обследованной группы лиц был выбран образец с повышенными значениями уровня анеуплоидии. Все этапы эксперимента проводили в одних и тех же условиях, подсчет FISH-сигналов — одним и тем же специалистом. Для FISH-анализа применяли зонды с прямым мечением. Всего в данном эксперименте проанализировано 5000 клеток.

Установлено, что среднее значение анеуплоидии по четырем хромосомам с прямым мечением может отклоняться на величину 0.13 %, что составляет 1.3 клетки на 1000. Для разных хромосом этот показатель варьирует от 0.05 до 0.10 %. Относительная ошибка метода, по нашим данным, составила 4.08 %. Ни в одном случае не выявлено каких-либо достоверных различий между повторностями.

Обсуждение

Полученные в нашем исследовании результаты свидетельствуют о том, что частота выявляемых клеток с одним и тремя сигналами различается в зависимости от типа применяемых ДНК-зондов. Во всех случаях при использовании ДНК-зондов непрямого мечения частота анеуплоидных клеток была достоверно выше, чем в случае использования зондов с прямым мечением. Можно предположить, что вследствие дополнительного этапа иммунохимической детекции число артефактных сигналов увеличивается.

Согласно нашим данным, установлена определенная зависимость уровня анеуплоидии от культивирования, при этом процесс культивирования не изменял общей картины соотношения частот анеуплоидии по четырем хромосомам. Некоторыми исследованиями показано, что частота анеуплоидии в клетках крови напрямую зависит от времени их культивирования и значительно выше в 72-часовых культурах, чем в 48-часовых у здоровых доноров (Richard et al., 1993). По другим данным, у здоровых индивидов как в некультивированных, так и в культивированных лейкоцитах не наблюдалось статистически значимых различий между частотами числовых нарушений по отдельным хромосомам при использовании ДНК-зондов с непрямым мечением (Тимошевский и др., 2006). В то же время у лиц, подвергавшихся длительное время воздействию вредных факторов внешней среды, частота анеуплоидии по шести хромосомам значимо возросла в культивированных клетках по сравнению с некультивированными (2.98 против 1.96 %).

С другой стороны, культивированные клетки могут иметь тот потенциальный артефакт при мозаицизме низкого уровня, при котором клетки с определенным кариотипом получают преимущества или ограниченные возможности пролиферации в культуре. FISH-исследование некультивированных клеток проводится на исходной популяции клеток и может давать более достоверные результаты.

При анализе эффекта культивирования нельзя не учитывать тот факт, что клеточный состав культивированной и некультивированной крови может существенно различаться. В некультивированной крови лейкоцитарная фракция характеризуется преобладанием сегментоядерных нейтрофилов и меньшим содержанием лимфоци-

тов (25—40 %). В процессе культивирования клеток крови ФГА-индуцированной пролиферации подвержены в основном Т-лимфоциты, они начинают доминировать в культуре (70 %) над остальными клетками (Rooney, 2001). Поэтому при изменении числа гипер- и гиподиплоидных клеток не исключено влияние изменения лейкоцитарного состава.

По нашему мнению, культивированные клетки также могут успешно применяться для анализа частот анеуплоидии наряду с некультивированными. Однако при анализе анеуплоидии низкого уровня необходимо принимать во внимание влияние культивирования для групп сравнения и учитывать контрольные уровни оценки минимальных частот.

X-хромосома представляет особый интерес для исследования, в связи с тем что X-анеуплоидия — более частое явление, чем анеуплоидия по аутосомам. В литературе приводятся сведения о повышении частоты анеуплоидии с возрастом женщин и преобладании клеточных клонов с потерей именно X-хромосомы над другими клеточными клонами (Richard et al., 1993; Russell et al., 2007). В нашем исследовании мы не обнаружили преобладания X-моносомии над другими хромосомными нарушениями. Можно предполагать, что, поскольку нашу группу составили относительно молодые женщины без репродуктивных нарушений с доказанной фертильностью, явление потери X-хромосомы не было характерным для данной группы.

Расчитанные значения верхних пределов выявления анеуплоидии по каждой хромосоме могут быть использованы как контрольные показатели нижнего уровня анеуплоидии для заключения о присутствии или отсутствии мозаицизма при его анализе. Пределы выявления гипер- и гипогаметоидных клеток представляют собой значения, ниже которых диагностика моносомии и трисомии становится невозможной. Особую актуальность задача разграничения мозаицизма низкого уровня и контрольных значений приобретает в диагностике мозаичных форм синдромов Шерешевского—Тернера и трисомии по X-хромосоме у женщин, а также в исследованиях, направленных на оценку эффектов скрытого гоносомного мозаицизма и мозаицизма низкого уровня в репродуктивной генетике. Предполагается, что «скрытый» мозаицизм, который плохо выявляется при стандартном цитогенетическом исследовании, и мозаицизм низкого уровня (анеуплоидный клон менее 10 %) могут быть ассоциированы с нарушением репродуктивной функции (Meschede et al., 1998; Зерова и др., 2005). Несмотря на высокую чувствительность метода FISH, для достаточных заключений необходимо использование контрольных, в частности предельных значений анеуплоидии.

В нашем исследовании установлена величина ошибки, которая может присутствовать в методе FISH, как и любом другом количественном методе. Полученная величина случайной ошибки (0.13 % в абсолютных единицах и 4.08 % в относительных) характеризует точность метода и необходима для представления о подлежащих измерению значениях. Точность средних показателей считается вполне удовлетворительной, если относительная ошибка не превышает 3—5 % (Лакин, 1990). Согласно современным рекомендациям Международной организации по стандартизации (ISO), при оценке точности измерения следует ориентироваться не на относительные, а на абсолютные величины (Балаховский, 2007).

Полученные в настоящем исследовании величины пределов выявления мутаций и ошибки метода характер-

ны для использованных параметров методики, а именно FISH-анализа с прямым мечением по четырем хромосомам культивированных клеток крови. Поскольку анализ многокомпонентен, возможны различные источники ошибок. В нашем эксперименте максимально учтены случайные ошибки, которые могут сопровождать этапы культивирования, фиксации, гибридизации, отмывки и детекции.

Сопоставление уровня анеуплоидии, определенного нами для контрольной группы с полученной величиной случайных ошибок, которые неизбежно сопровождают метод, позволяет заключить, что если частота анеуплоидии для каждой хромосомы не превышает 1 %, то величина случайной ошибки составляет десятые доли процента. Согласно нашим данным, величины анеуплоидии менее 0.05—0.10 %, т. е. 0.5—1 клетка на 1000, могут вызывать сомнения, поскольку лежат ниже или перекрываются с разрешающими возможностями метода.

В заключение можно отметить, что в результате проведенного исследования установлены пределы обнаружения различных типов анеуплоидии по исследуемым хромосомам и ошибка метода, сведения о которых могут быть использованы при диагностике мозаицизма низкого уровня. Показано, что соответствующие пределы средних частот гипо- и гиперпloidий несколько выше при использовании ДНК-зондов с непрямым мечением в сравнении с прямым в культивированных клетках по сравнению с некультивированными.

Список литературы

- Балаховский И. С. 2007. Границы нормы и точность лабораторных анализов. Клиническая лабораторная диагностика. 10 : 47—54.
- Ворсанова С. Г., Берешева А. К., Казанцева Л. З., Демидова И. А., Шаронин В. О., Соловьев И. В., Юров Ю. В. 1998. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции. Проблемы репродукции. 4 : 41—46.
- Зерова Т. Э., Кононенко М. И., Дарий А. С., Денисенко С. В. 2005. Значение FISH-метода для выявления «скрытого» мозаицизма по половым хромосомам у бесплодных супружеских пар. Проблемы репродукции. 5 : 68—73.
- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высшая школа. 350 с.
- Маца А. Н. 1990. Лимфоциты. Методы. М.: Мир. 240 с.
- Назаренко С. А., Тимошевский В. А. 2004. Анализ частоты спонтанной анеуплоидии в соматических клетках человека с помощью технологии интерфазной цитогенетики. Генетика. 40 (2) : 195—204.
- Назаренко С. А., Тимошевский В. А., Островерхова Н. В. 1997. Интерфазный анализ X-анеуплоидии методом флуоресцентной гибридизации in situ в разных тканях здоровых лиц. Генетика. 33 (10) : 1426—1430.
- Тимошевский В. А., Лебедев И. Н., Назаренко С. А. 2006. Биологическая индикация мутагенных воздействий: анализ числовых хромосомных нарушений в интерфазных клетках человека (наследственность и здоровье): Учебное пособие. Томск: «Печатная мануфактура». 40 с.
- Шилова Н. В., Золотухина Т. В. 2007. Интерфазная флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) в диагностике числовых хромосомных aberrаций. Мед. генет. 6 : 53—58.
- Aardema M. J., Albertini S., Arni P., Henderson L. M., Kirsch-Volders M., Mackay J. M., Sarrif A. M., Stringer D. A., Talman R. D. 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. Mutat. Res. 410 : 3—79.
- Beatty B., Mai S., Squire J. 2002. FISH: a practical approach. Oxford Univ. Press. 260 p.
- Clementini E., Palka C., Iezzi I., Stuppia L., Guanciali-Franchi P., Tiboni G. M. 2005. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. Hum. Reprod. 20 : 437—442.
- Fenech M. 2002. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. Drug Discov. 7 : 1128—1137.
- Goldberg-Bittman L., Kitay-Cohen Y., Hadari R., Yuklac M., Fejgina M. D., Amiel A. 2008. Random aneuploidy in chronic hepatitis C patients. Cancer Genet. Cytogenet. 108 : 20—23.
- Iarmarcovai G., Botta A., Orsiere T. 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. Toxicol. Lett. 166 : 1—10.
- Leach N. T., Rehder C., Jensen K., Holt S., Jackson-Cook C. 2004. Human chromosomes with shorter telomeres and large heterochromatin regions have a higher frequency of acquired somatic cell aneuploidy. Mech. Ageing Develop. 125 : 563—573.
- Lenz P., Luetjens C. M., Kamischke A., Kuhnert B., Kennerknecht I., Nieschlag E. 2005. Mosaic status in lymphocytes of infertile men with or without Klinefelter syndrome. Hum. Reprod. 20 : 1248—1255.
- Lomax B., Kalousek D., Kuchinka B. 1994. The utilization of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism. Hum. Genet. 93 : 243—247.
- Meschede D., Lemcke B., Exeler J. R., De Geyter Ch., Behre H. M., Nieschlag E., Horst J. 1998. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection — prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. Hum. Reprod. 13 : 576—582.
- Munne S., Marques C., Magli C., Morton P., Morrison L. 1998. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18, 21 and 22. Mol. Hum. Reprod. 4 : 863—870.
- Papanikolaou E. G., Vernaev V., Kolibianakis E., Van Assche E., Bonduelle M., Liebaers I., Van Steirteghem A., Devroey P. 2005. Is chromosome analysis mandatory in the initial investigation of normovulatory women seeking infertility treatment? Hum. Reprod. 20 : 2899—2903.
- Richard F., Aurias A., Couturier J., Dutrillaux A. M., Flury-Herard A., Gerbault-Seureau M., Hoffschir F., Lamoliatte E., Lefrancois D., Lombard M. 1993. Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. Mutat. Res. 2 : 71—80.
- Rooney D. 2001. Human cytogenetics: constitutional analysis. Oxford Univ. Press. 285 p.
- Russell L. M., Strike P., Browne C. E., Jacobs P. A. 2007. X chromosome loss and aging. Cytogenet. Genome Res. 3 : 181—185.

SPONTANEOUS ANEUPLOIDY LEVEL IN BLOOD CELLS OF FERTILE FEMALES

N. V. Zotova,¹ E. V. Markova,¹ I. N. Lebedev,² A. V. Svetlakov¹

¹ Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk,
and ² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk Research Center RAMS;
e-mail: ¹ krasivf@kcrm.ru, ² igor.lebedev@medgenetics.ru

In this study we present the results of molecular-cytogenetic investigation of blood cells of fertile women of reproductive age. We used cultivated and uncultivated cells and two sets of FISH probes with direct and indirect labeling. The mean aneuploidy levels of 4 chromosomes were determined and statistical limits were scored. Aneuploidy levels determined in cultivated lymphocytes by multicolor FISH varied from 0.1 to 1.3 %. The mean aneuploidy level for all chromosomes (13, 18, 21 and X) was 1.39 %. The limit mutation detection was 3.4 %. We found differences in results obtained with the use of direct and indirect labeling. It was shown that cultivating process influenced the aneuploidy level. Absolute error of FISH technique was 0.13 %, relative error — 4.08 %.

Key words: spontaneous aneuploidy level, accuracy of FISH technique.

—————