

**АНЕУПЛОИДИЯ В ЦИТОТРОФОБЛАСТЕ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНЫМ  
ГЛОБАЛЬНЫМ УРОВНЕМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА**

Р.Р. Савченко<sup>1</sup>, С.А. Васильев<sup>2</sup>

Научный руководитель: к. б. н. С.А. Васильев

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,

<sup>2</sup>НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: [savchenko\\_renata@mail.ru](mailto:savchenko_renata@mail.ru)

**ANEUPLOIDY IN HUMAN EMBRYONIC CYTOTROPHOBLAST WITH DIFFERENT LEVEL OF  
GLOBAL GENOME METHYLATION**

R.R. Savchenko<sup>1</sup>, S.A. Vasilyev<sup>2</sup>

Scientific Supervisor: S.A. Vasilyev, PhD

<sup>1</sup>National Research Tomsk State University,

<sup>2</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center

of Russian Academy of Science

Russia, Tomsk, 36 Lenin Ave., 634050

E-mail: [savchenko\\_renata@mail.ru](mailto:savchenko_renata@mail.ru)

**Abstract.** *In this study, we investigated the frequency of aneuploidy of chromosomes 8 and X in human embryonic tissues with different level of global genome methylation. A comparative analysis of the methylation index of LINE-1 retrotransposon, which is largely reflecting the methylation profile of the genome, is performed in cytotrophoblast cells of 24 spontaneous abortions with a normal karyotype, as well as in the control group of 17 induced abortions of the first trimester of pregnancy. It was shown that the cytotrophoblast of spontaneous abortions with normal karyotype and with hypomethylation of LINE-1 is characterized by increased frequency of aneuploidy of chromosome 8, however, the frequency of aneuploidy of X chromosome was not differed significantly between the explored groups of abortions. In addition, it should be noted, that the high frequency of aneuploidy in the cytotrophoblast cells of abortions was much higher than it was detected in other tissues of the human organism.*

**Введение.** Высокая частота репродуктивных потерь, характерная для ранних этапов онтогенеза человека, имеет многофакторную природу. Доминирующая роль в этиологии нарушений раннего эмбрионального развития отводится генетическим факторам, при этом около половины внутриутробно погибших зародышей имеют числовые аномалии хромосомного набора. Оставшаяся значительная часть спонтанных абортусов характеризуется нормальным кариотипом, и причины остановки их развития часто остаются неясными. За последние годы в литературе накапливаются сведения о значительной роли не только генетических, но и эпигенетических аномалий, несовместимых с нормальным протеканием эмбрионального развития, особое место среди которых занимает изменение профиля метилирования ДНК. Предположительно, снижение уровня глобального метилирования генома оказывает влияние на частоту возникновения числовых хромосомных aberrаций в следствие гипометилирования цитозина в

центромерных и прицентромерных участках хромосом [1], которое, в свою очередь, приводит к изменению конформации прицентромерного хроматина, нарушениям прикрепления микротрубочек веретена деления к хромосомам и, в конечном итоге, к неправильной сегрегации хромосом и анеуплоидии. Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в оценке частоты возникновения числовых хромосомных нарушений в клетках цитотрофобласта эмбрионов человека с различным глобальным уровнем метилирования генома.

**Материалы и методы исследования.** Был проведен анализ частоты анеуплоидии по хромосомам 8 и X в клетках цитотрофобласта хориона 24 спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (46,XX – 16, 46,XY – 8 образцов) и 17 медицинских абортусов (46,XX – 8, 46,XY – 9 образцов). Оценка индекса метилирования LINE-1, являющегося маркером глобального уровня метилирования генома, осуществлялась с помощью пиросеквенирования по протоколу, описанному в [2]. Частота анеуплоидии оценивалась в клетках, выделенных из цитотрофобласта без этапа культивирования, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) с ДНК-зондами, специфичными к центромерным участкам хромосом 8 и X по протоколу, описанному в [3]. Для сравнения групп использовался непараметрический тест Манна-Уитни. Корреляционный анализ производился с помощью рангового теста корреляции Спирмена.

**Результаты.** Частота анеуплоидии по хромосоме X, как и ожидалось, оказалась значительно выше у абортусов женского пола по сравнению с абортусами мужского пола в обеих исследованных группах. Различий по частоте анеуплоидии хромосомы 8 между абортусами обоих полов не выявлено ( $p < 0,01$ ) (табл.1). В группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом наблюдалась повышенная частота анеуплоидии по хромосоме 8, а также повышенная суммарная частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X по сравнению с группой медицинских абортусов ( $p = 0,048$  и  $p = 0,034$ , соответственно) (табл. 1). Среди зародышей мужского пола была обнаружена повышенная частота хромосомы 8 и суммарная частота анеуплоидии по обоим хромосомам ( $p = 0,04$  и  $p = 0,024$ , соответственно) по сравнению с медицинскими абортусами, в то время как частота анеуплоидии по хромосоме X не отличалась значимо между группами абортусов как отдельно в группах с мужским и женским кариотипом, так и в объединенной выборке, хотя она и была немного выше в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (табл. 1).

Индекс метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов ( $40,50 \pm 4,57\%$ ) был статистически значимо ниже по сравнению с группой медицинских абортусов ( $45,36 \pm 7,25\%$ ) ( $p = 0,05$ ) (табл. 1). При этом, помимо среднего уровня метилирования LINE-1, значимые отличия между группами наблюдались только по второму из проанализированных CpG-сайтов в промоторе LINE-1 ( $37,23 \pm 6,10\%$  и  $46,38 \pm 8,30\%$  в группах спонтанных и медицинских абортусов, соответственно,  $p = 0,004$ ) (табл. 1).

Для среднего индекса метилирования LINE-1 в группе спонтанных абортусов была показана обратная корреляция с частотой анеуплоидии по хромосоме 8 ( $R = -0,34$ ,  $p = 0,12$ ) и суммарной частотой анеуплоидии по хромосомам X и 8 ( $R = -0,36$ ,  $p = 0,095$ ), однако статистически значимыми данные корреляции являлись лишь для второго из проанализированных CpG-сайтов в промоторе LINE-1 ( $R = -0,53$ ,  $p = 0,011$  и  $R = -0,58$ ,  $p = 0,005$ , соответственно). Корреляции между индексом метилирования LINE-1 с частотой анеуплоидии по хромосоме X, а также с частотами анеуплоидии по обоим исследованным хромосомам в группе медицинских абортусов оказались статистически незначимыми.

Таблица 1

Частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X и средний индекс метилирования LINE-1 в группах спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и медицинских абортусов

		46,XY	46,XX	Объединенная выборка
СА	Частота анеуплоидии по хромосоме 8, %	2,87 ± 0,78; 1,90-4,30	2,66 ± 1,40; 1,00-5,69	2,73 ± 1,22; 1,00-5,69
	Частота анеуплоидии по хромосоме X, %	0,73 ± 0,54; 0,20-1,90	1,79 ± 1,02; 0,50-3,90	1,44 ± 1,01; 0,20-3,90
НК	Суммарная частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X, %	3,60 ± 1,03; 2,10-5,20	4,45 ± 2,05; 2,00-8,27	4,17 ± 1,80; 2,00-8,27
	Средний индекс метилирования LINE-1, %	39,96 ± 4,42; 33,33-46,33	40,81 ± 4,80; 32,00-49,33	40,50 ± 4,58; 32,00-49,33
МА	Частота анеуплоидии по хромосоме 8, %	1,86 ± 0,87; 1,17-3,37	2,03 ± 0,85; 0,80-3,14	1,95 ± 0,84; 0,80-3,37
	Частота анеуплоидии по хромосоме X, %	0,39 ± 0,20; 0,00-0,60	1,61 ± 0,98; 0,47-3,50	1,03 ± 0,91; 0,00-3,50
	Суммарная частота анеуплоидии по хромосомам 8 и X, %	2,24 ± 0,97; 1,30-3,77	3,64 ± 1,18; 2,30-5,56	2,98 ± 1,27; 1,30-5,56
	Средний индекс метилирования LINE-1, %	45,67 ± 8,08; 38,00-57,67	45,00 ± 6,89; 34,33-54,00	45,36 ± 7,25; 34,33-57,67

Примечание: СА НК – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом; МА – медицинские абортусы; 46,XY – абортусы мужского пола; 46,XX – абортусы женского пола; данные представлены в виде среднего ± станд. отклонения; минимум-максимум.

**Закключение.** Таким образом, в цитотрофобласте спонтанных абортусов с нормальным кариотипом и гипометилированием LINE-1 было обнаружено повышение частоты анеуплоидии по хромосоме 8 в условиях *in vivo*. Возможно, что высокая частота нарушений сегрегации хромосом в клетках спонтанных абортусов с нормальным кариотипом отражает повышенный уровень хромосомной нестабильности на фоне гипометилирования генома. В целом, необходимо отметить высокую частоту анеуплоидии в клетках цитотрофобласта, значительно превышающую выявляемую в других тканях организма.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schueler, M. G., Sullivan B. A. (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, no 7. pp. 301 – 313.
- Васильев С. А., Толмачева Е. Н., Кашеварова А. А., Саженова Е. А., Лебедев И. Н. Статус метилирования ретротранспозона LINE-1 при хромосомном мозаицизме на ранних стадиях эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. – 2015. – №1. – С. 165 – 174.
- Васильев С. А., Тимошевский В. А., Лебедев И. Н. Цитогенетические механизмы генерации анеуплоидии в соматических клетках профессионалов ядерно-химического производства с инкорпорированным плутонием 239. // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 11. – С. 1565 – 1570.