

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРОВ	10
I. ВВЕДЕНИЕ.....	14
II. ГЕНОМНЫЕ ВАРИАЦИИ.....	18
II.1. Классификация.....	21
II.2. Межиндивидуальные геномные вариации.....	24
II.3. Межклеточные или соматические геномные вариации.....	28
III. ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ: ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ, ЧАСТОТА И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ.....	31
III.1. Численные хромосомные аномалии.....	32
III.2. Механизмы формирования численных хромосомных аномалий.....	34
III.3. Мейотическое нерасхождение хромосом.....	35
III.4. Митотическое нерасхождение хромосом.....	38
III.5. Другие механизмы формирования численных хромосомных аномалий в соматических клетках.....	43
III.6. Анеуплоидия аутосом.....	46
III.6.1. Частота.....	47
III.6.2. Фенотипические проявления.....	54
III.7. Анеуплоидия гоносом (половых хромосом).....	64
III.7.1. Частота.....	65
III.7.2. Фенотипические проявления.....	67
III.8. Полиплоидия.....	69
III.9. Структурные хромосомные аномалии.....	70
III.9.1. Частота.....	72
III.9.2. Механизмы формирования.....	78
III.9.3. Специфика организации генома и формирование структурных хромосомных аномалий.....	81
III.9.4. Фенотипические проявления.....	83
III.10. Маркерные хромосомы.....	84
IV. ХРОМОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ.....	87
IV.1. Частота хромосомного мозаицизма на разных стадиях онтогенеза.....	89
IV.1.1. Тканеспецифический мозаицизм.....	94
IV.1.2. Механизмы формирования.....	96
V. ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ.....	97
V.1. Формы хромосомной нестабильности: классификация и механизмы формирования.....	98
V.2. Анеуплоидизация.....	102
V.3. Сайты ломкости хромосом.....	104
V.4. Фенотипические проявления хромосомной нестабильности.....	105
V.4.1. Синдромы хромосомной нестабильности.....	108
V.4.1.1. Атаксия-телеангиэктазия.....	109

V.4.1.2. Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при атаксии-телеангиэктазии.....	111
V.5. Малигнизация.....	126
V.6. Старение.....	127
VI. ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ И ГЕНОМНЫЕ ВАРИАЦИИ ПРИ БОЛЕЗНЯХ МОЗГА.....	129
VI.1. Умственная отсталость.....	130
VI.1.1. Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования детей с умственной отсталостью и/или ВПР.....	133
VI.1.2. Молекулярно-цитогенетический анализ происхождения дополнительной хромосомы 21 у детей с синдромом Дауна.....	144
VI.1.3. Анализ хромосомных структурных перестроек методом сравнительной геномной гибридизации (HR-CGH).....	148
VI.1.4. Анализ хромосомных структурных перестроек с помощью ДНК-микроматриц (array CGH).....	153
VI.2. Аутизм.....	158
VI.2.1. Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования детей с аутизмом и их матерей.....	161
VI.2.2. Хромосомные аномалии и гетероморфизм гомологов по гетерохроматиновым участкам хромосом у детей с аутизмом.....	163
VI.2.3. Гетероморфизм хромосом, хромосомная нестабильность и нервно-психические нарушения в семьях детей с аутизмом.....	167
VI.2.4. Мозаичная анеуплоидия у детей с аутизмом.....	170
VI.2.5. Картирование генов-кандидатов и определение молекулярных процессов, связанных с патогенезом аутистических расстройств.....	173
VI.3. Шизофрения.....	178
VI.3.1. Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при шизофрении.....	182
VI.4. Болезнь Альцгеймера.....	186
VI.4.1. Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при болезни Альцгеймера.....	189
VII. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФЕНОМЕНЫ, СВЯЗАННЫЕ СО СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИЕЙ ГЕНОМА.....	201
VII.1. Эухроматин и гетерохроматин.....	202
VII.2. Эпигенетические процессы, связанные с численными и структурными вариациями генома.....	205
VII.3. Анеуплоидизация и эпигенетические феномены.....	206
VII.4. Вариации гетерохроматиновых участков хромосом.....	209
VII.5. Вариации гетерохроматиновых участков хромосом при нервных и психических заболеваниях.....	213
VII.6. Факультативный гетерохроматин.....	215
VIII. АРХИТЕКТОНИКА ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА.....	217
VIII.1. Современные представления о хромосомной организации интерфазного генома.....	217
VIII.1.1. Организация хромосом в интерфазном ядре и активность генома.....	222

VIII.1.2. Межклеточные вариации хромосом в интерфазном ядре в норме и при патологии.....	224
IX. МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ ГЕНОМНЫХ ВАРИАЦИЙ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ И ПОСТМОРТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	228
IX.1. Соматические геномные вариации и хромосомная нестабильность в эмбриональных клетках мозга, кожи и ворсин хориона.....	232
IX.2. Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга в норме.....	239
X. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ, ПРИЧИН ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ.....	243
X.1. Определение функциональных последствий хромосомных аномалий.....	243
X.1.1. Анализ функциональных последствий анеуплоидии и хромосомной нестабильности.....	244
X.1.2. Идентификация хромосомного мозаицизма.....	251
X.1.3. Анализ функциональных последствий структурных хромосомных перестроек.....	256
X.1.4. Анализ возможных причин возникновения структурных хромосомных аномалий.....	261
XI. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНТЕРФАЗНЫХ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ НЕРВНЫХ И ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ.....	265
XI.1. Организация интерфазных хромосом в клетках головного мозга в норме.....	265
XI.2. Организация интерфазных хромосом в клетках головного мозга при шизофрении, болезни Альцгеймера и атаксии-телеангиэктазии.....	272
XII. ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ.....	275
XIII. ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ И ПАТОГЕНЕЗ НЕРВНО-ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ТЕОРИЯ МОЗАИЧНОСТИ ГЕНОМА МОЗГА.....	277
XIV. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ЦИТОГЕНОМИКЕ МОЗГА.....	282
ПРИЛОЖЕНИЕ I. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ ВАРИАЦИЙ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ.....	286
I. Цитогенетические методы.....	286
I.1. Получение препаратов для цитогенетического анализа.....	286
I.1.1. Культивирование лимфоцитов периферической крови: приготовление препаратов метафазных хромосом.....	287
I.1.2. Приготовление препаратов интерфазных ядер различных тканей.....	287
I.1.3. Дифференциальное окрашивание хромосом по длине.....	288
I.1.3.1. G-окрашивание хромосом.....	289
I.1.3.2. C-окрашивание хромосом.....	289
I.1.4. Анализ хромосом под микроскопом.....	289
II. Молекулярно-цитогенетические методы.....	290
II.1. Получение препаратов для молекулярно-цитогенетического анализа.....	290
II.2. Флюоресцентная гибридизация на предметном стекле (in situ) (FISH).....	290

II.3. Сравнительная геномная гибридизация (метафазная CGH или HR-CGH).....	292
II.3.1. Применение метода высокоразрешающей CGH (HR-CGH)	293
II.4. Серийная сравнительная геномная гибридизация (серийная CGH или агау CGH).....	294
II.5. Флюоресцентная гибридизация пептидно-нуклеиновых соединений in situ (PNA).....	297
II.6. Мечение хромосом с помощью хромосомоспецифических праймеров в полимеразной реакции (PRINS).....	298
II.7. Многоцветное дифференциальное окрашивание хромосом (MCB).....	299
II.7.1. Анализ с помощью хромосомоспецифического многоцветного окрашивания (ICS-MCB).....	300
II.8. Количественная флюоресцентная гибридизация на предметном стекле (in situ) (QFISH).....	303
II.8.1. Анализ с помощью QFISH.....	303
II.9. Иммунофлюоресцентный анализ в сочетании с FISH (иммуно-FISH).....	306
II.9.1. Анализ с помощью многоцветовой иммуно-FISH (иммуно-MFISH).....	306
II.10. ДНК пробы и олигонуклеотиды, использованные в исследованиях по изучению нестабильности генома.....	306
II.10.1. ДНК-полимеразная реакция замещения (ник-трансляция).....	307
III. Применение молекулярно-цитогенетических методов.....	309
III.1. Молекулярно-цитогенетическая диагностика	309
III.2. Применение молекулярно-цитогенетических методов в фундаментальных биомедицинских исследованиях	312
IV. Интерфазная молекулярная цитогенетика.....	313
IV.1. Интерфазная молекулярно-цитогенетическая диагностика и исследования хромосомного мозаицизма и нестабильности	316
V. Молекулярно-генетические методы	317
V.1. Выделение ДНК из клеток лимфоцитов периферической крови	318
V.2. Определение концентрации ДНК.....	319
V.3. Анализ нерасхождения хромосомы 21	319
V.4. Анализ инактивации хромосомы X.....	320
ПРИЛОЖЕНИЕ II. ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ И СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЭЛЕКТРОННЫХ РЕСУРСОВ И СХЕМА ДИАГНОСТИКИ С УЧЕТОМ СОМАТИЧЕСКИХ ГЕНОМНЫХ ВАРИАЦИЙ И МОЗАИЦИЗМА. ПЕРСПЕКТИВЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ (СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ) В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	321
I. Биоинформатический анализ	321
I.1. Применение биоинформатического анализа	322
II. Статистический анализ	324
III. Список использованных электронных ресурсов.....	324
IV. Схема диагностики хромосомных аномалий и микроперестроек с учетом соматических геномных вариаций и мозаицизма	326
V. Перспективы молекулярного карiotипирования или сравнительной геномной гибридизации (агау CGH) в клинической практике.....	328
ЛИТЕРАТУРА.....	353

VI.3.1. Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при шизофрении

По данным различных исследований от 1 до 4% случаев шизофрении связаны с численными хромосомными аномалиями (Юров, Ворсанова, 2001; Юров и др., 2006б; DeLisi et al., 1994; Bassett et al., 2000; Demirdag, Taştemir, 2003; McGuffin et al., 2004). Помимо этого, некоторые работы отмечают GIN в виде нестабильности метилирования промоторов генов (Abdomaleky et al., 2006), а также CIN в виде повышенной ломкости хромосом при данном заболевании (Chen et al., 1998). С другой стороны, разнообразные геномные вариации (перестройки), выявляемые в клетках крови у индивидуумов, страдающих шизофренией, также указывают на возможную роль GIN в патогенезе этой самой распространенной психической болезни (Van Os, Karag, 2009). Поскольку очевидно, что при шизофрении, в первую очередь, нарушены функции головного мозга, нами была предложена оригинальная гипотеза о том, что GIN или CIN должны преимущественно поражать клетки головного мозга. В частности, предполагалось, что некоторые случаи этого заболевания могут быть связаны с хромосомными аномалиями непосредственно в тканях головного мозга. Для подтверждения предложенной гипотезы был проведен МЦГ анализ постмортальных клеток головного мозга 18 индивидуумов с шизофренией и 18 — из контрольной группы (поля Бродмана 10, 17 и 18 /кора головного мозга/, хвостатое ядро, гиппокамп). Исследование проводилось с помощью комплекса методов, представленных в приложении для определения СГВ в неделящихся клетках (Yurov et al., 2008).

Сочетание методов MFISH/QFISH и ICS-MCB с ДНК пробой на хромосомы 1, 9, 15-18, X и Y (рис. 35) позволило исследовать примерно 1 млн клеток головного мозга больных шизофренией и контрольных образцов. С целью воспроизведения данные образцы были закодированы и исследовались дважды с помощью методов MFISH/QFISH. В ходе исследования было обнаружено, что в головном мозге больных шизофренией наблюдается хромосомоспецифическая нестабильность в виде анеуплоидии хромосомы 1, а также в двух случаях был обнаружен низкопроцентный мозаицизм моносомии/трисомии хромосомы 1. В случаях мозаицизма моносомия наблюдалась в 3,6%, трисомия — в 4,7% (Yurov et al., 2008) (рис. 36).

Анализ контрольных образцов показал, что частота анеуплоидии хромосомы 1 составляет 0,6% (0,3% — моносомия /0,2–0,4%/; 0,3% — трисомия /0,2–0,4%/) (рис. 36А), $M+3SD = 0,7\%$. Случаев низкопроцентного мозаицизма в контрольных образцах обнаружено не было. Средний уровень анеуплоидии хромосомы 1 в образцах головного мозга при шизофрении был оценен как 1,8% (0,9% — моносомия /0,3–1,5%/; 0,9% — трисомия

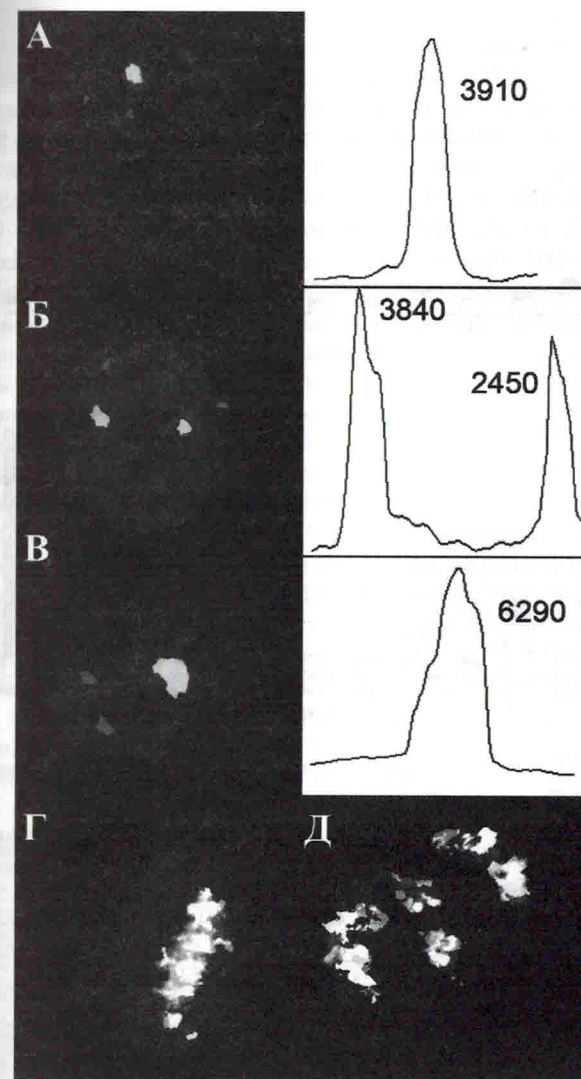


Рис. 35 (см. также на цвет. вкл.). МЦГ анализ анеуплоидии клеток головного мозга больных шизофренией. Интерфазная MFISH/QFISH с центромерными ДНК пробями: (А) ядро с моносомией хромосомы 1 (один сигнал; относительная интенсивность 3910) и с дисомией хромосомы X; (Б) ядро с дисомией хромосомы 1 (два сигнала; относительная интенсивность 3840 и 2450) и дисомией хромосомы X; (В) ядро с дисомией хромосомы 1 (один сигнал; относительная интенсивность 6290) и с дисомией хромосомы X. ICS-MCB при применении ДНК пробы на хромосому 1: (Г) моносомия и (Д) трисомия (Yurov et al., 2008)

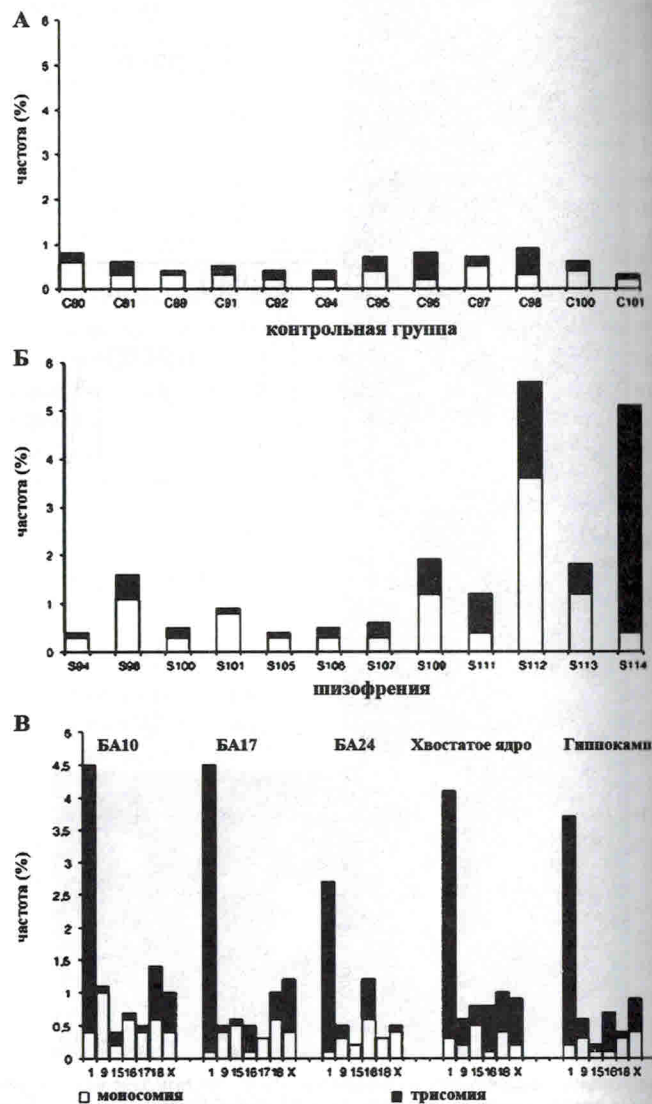


Рис. 36. Частота анеуплоидных клеток (моносомия – белые столбцы; трисомия – черные столбцы) в контрольной группе (А) и у индивидуумов с шизофренией (Б). (В) Частота анеуплоидных клеток в разных областях мозга пациента с шизофренией, у которого была обнаружена низкопроцентная трисомия хромосомы 1 (БА – поля Бродмана – Brodmann areas) (Yurov et al., 2008)

и 1–1,7%/). При определении среднего уровня анеуплоидии хромосомы 1 без учета двух случаев низкопроцентного мозаицизма он составил 1,1% (0,6% – моносомия /0,3–0,9%/; 0,5% – трисомия /0,2–0,9%/), $M+3SD$ – 0,7% и статистически достоверно отличались от контроля ($p=0,005$ и $p=0,001$ для моносомии и трисомии, соответственно) (рис. 36А,Б). Наличие мозаичной анеуплоидии хромосомы 1 было подтверждено при анализе некоторых областей головного мозга – кора головного мозга (поля Бродмана 10, 17 и 24), хвостатое ядро и гиппокамп (рис. 36В). Таким образом, нами было показано, что в клетках головного мозга при шизофрении увеличен уровень хромосомоспецифичной CIN в виде анеуплоидии хромосомы 1 и также, что определенное число случаев этого заболевания может быть связано с низкопроцентной мозаичной трисомией или моносомией хромосомы 1 в клетках головного мозга.

При анализе других хромосом было обнаружено три дополнительных случая низкопроцентного мозаицизма в клетках головного мозга при шизофрении. В одном была обнаружена моносомия хромосомы 18 в 3,2% клеток. Исследование контрольных образцов подобную аномалию выявило в 0,3% клеток. Увеличение уровней CIN в виде стохастической анеуплоидии хромосомы 18 в клетках головного мозга больных шизофренией также обнаружено не было: 0,4% – контрольные образцы (0,3% моносомия и 0,1% трисомия), 0,5% – образцы индивидуумов с шизофренией (0,3% моносомия и 0,2% трисомия) $M+3SD$ для шизофрении и контроля – 0,6% ($p<0,05$). Два других случая низкопроцентного мозаицизма представляли собой сочетанные аномалии: трисомия хромосомы 18 и трисомия хромосомы X (рис. 37). В одном образце трисомия хромосомы X была выявлена в 4% клеток, а трисомия хромосомы 18 – в 2,5% клеток. Во втором – трисомия хромосомы X

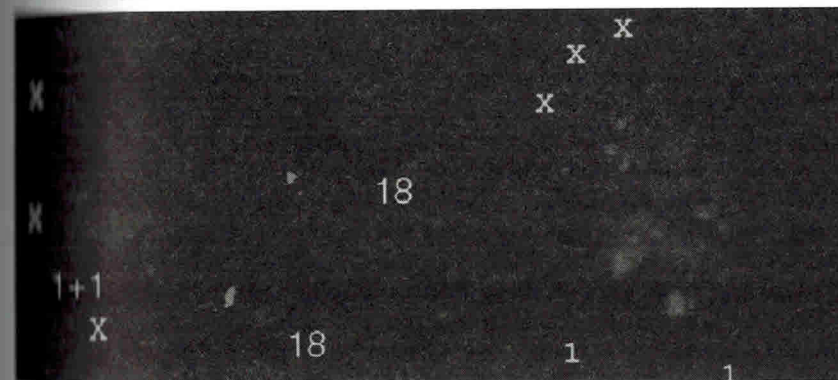


Рис. 37 (см. также на цвет. вкл.). Мозаичная трисомия хромосомы X в клетках головного мозга пациента с шизофренией (пол женский) (Yurov et al., 2001a)

обнаружена в 3% клеток, а трисомия хромосомы 18 — в 0,5% клеток. Анализ других аутосом (хромосомы 9, 15, 16, 17) и хромосомы Y также не выявил повышенного уровня CIN в виде стохастической анеуплоидии, который варьировал в пределах 0,2%–0,6% в контроле и 0,3%–0,7% — при шизофрении. Увеличение уровней CIN в виде стохастической анеуплоидии хромосомы 1 (моносомии и трисомии) было также не обнаружено: 1,2%–1,7% в контроле и 1,5%–1,9% — при шизофрении.

В результате проведенного МЦГ исследования постмортальных образцов головного мозга индивидуумов, страдающих шизофренией, и контрольных образцов было показано, что при этом заболевании повышен уровень CIN, проявляющейся в виде мозаичной анеуплоидии хромосомы 1. Около 10% случаев шизофрении ассоциированы с низкопроцентной мозаичной анеуплоидией: трисомией хромосомы 1, моносомией хромосомы 1, моносомией хромосомы 18 и сочетанной трисомией хромосом 18 и X, обнаруженной в единичных случаях. Учитывая полученные нами данные, можно сделать обоснованный вывод о том, что определенное число случаев шизофрении может быть связано с хромосомным мозаицизмом в клетках головного мозга. Повышенный уровень CIN, вероятно, отражает результат нарушений ДНК в ходе развития, которые описаны ранее при шизофрении (Jarskog et al., 2003). Более того, согласно литературным данным, гены хромосомы 1 участвуют в различных процессах, происходящих в ЦНС, которые нарушены в клетках головного мозга пациентов с данным заболеванием (Camargo et al., 2007). Следовательно, увеличение CIN и низкопроцентная мозаичная анеуплоидия в тканях ЦНС при шизофрении могут рассматриваться как факторы риска, связанные, вероятно, с механизмами этого гетерогенного заболевания.

VI.4. Болезнь Альцгеймера

БА является самым частым заболеванием, связанным с аномальным старением и нейродегенерацией в позднем онтогенезе (Тиганов и др., 2011). МЦГ исследования позволили определить гены, мутации в которых приводят к этому социально значимому заболеванию: при формах с ранней манифестацией от 50% до 70% случаев вызваны мутациями в одном из трех генов — ген белка амилоидного предшественника (*APP*) и два гена, кодирующие белки класса пресенилинов (*PSI* и *PSII*). В 20–50% случаев БА (с ранней и поздней манифестацией) наблюдается изменение последовательности ДНК гена аполипопротеина E (*APOE*), связанное с нарушением активности белка. В настоящее время принято считать, что БА является генетически гетерогенным психическим заболеванием, связанным с изменениями ДНК как минимум трех генов (Dillen, Annaert, 2006; Swerdlow, 2007; Thomas, Fenech, 2007; Yurov et al., 2011). Исследования CNVs при БА с ранней манифестацией обнаружили дубликации гена *APP*, который расположен в участке 21q21, позволяя предположить, что геномные перестройки локусов хромосомы

21 могут иметь патологическое значение для этого заболевания (Rovelet-Salvati et al., 2006). Наиболее вероятным молекулярным механизмом БА является нарушение экспрессии гена *APP*, в результате которого образуется патологический продукт транскрипции — Aβ42, связанный с генотоксичным эффектом в клетках ЦНС и образованием амилоидных бляшек в головном мозге больных. Важно отметить, что этот феномен может быть следствием не только мутаций в этом гене, но также дубликаций и точковых мутаций в генах пресенилина (*PSEN1* и *PSEN2*), продукты транскрипции которых взаимодействуют с *APP* (Dillen, Annaert, 2006; Swerdlow, 2007; Thomas, Fenech, 2007; Yurov et al., 2011). Эти наблюдения легли в основу теории патогенеза БА, называемой «теорией амилоидного каскада», которая предлагает в качестве основной причины нейродегенерации наличие Aβ42 в клетках головного мозга, вызванного мутациями генов *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* или дубликациями *APP*, а все остальные нарушения, выявляемые на тканевом или клеточном уровнях, являются результатом генотоксичного эффекта патологического побочного продукта транскрипции (Aβ42). Однако, основное звено этого «каскада» до настоящего времени остается неизвестным (Swerdlow, 2007; Thomas, Fenech, 2007) (рис. 38).

В данном контексте нельзя не упомянуть о другой гипотезе, выдвигающей в качестве основного патологического процесса, приводящего к нейродегенерации при БА, анеуплоидизацию клеток головного мозга. Ее возникновение связано с наблюдениями, свидетельствующими о том, что неврологическая симптоматика при БА совпадает с синдромом Дауна, в результате чего было выдвинуто предположение о возможной связи нейродегенерации при БА и трисомии хромосомы 21 (Potter, 1991). Однако ЦГ исследования лимфоцитов крови и фибробластов кожи привели к противоречивым результатам. С одной стороны, использование культивирования и ЦГ методов демонстрировало как отсутствие хромосомных аномалий (за исключением анеуплоидии, связанной со старением) в клетках пациентов с БА, так и повышенный уровень соматических хромосомных мутаций (Buckton et al., 1983). С другой стороны, МЦГ анализ методом FISH фибробластов кожи показал наличие небольшой, но статистически значимой популяции клеток с дополнительной хромосомой 21. Иными словами, при БА выявляются СГВ в виде низкопроцентного хромосомного мозаицизма по анеуплоидии хромосомы 21 (Geller, Potter, 1999). Впоследствии, используя трансфекцию клеток человека в организмы модельных животных, несколько работ показали, что мутации в генах *APP* и *PSEN1* могут быть причиной анеуплоидизации клеток головного мозга (Boerger et al., 2008; Granic et al., 2010; Yurov et al., 2011). На основе этих наблюдений было выдвинуто предположение о том, что в пораженных клетках ЦНС должны присутствовать изменения течения клеточного цикла, вызывающие межклеточные вариации генома в тканях головного мозга, которые, в свою очередь, связаны с нейродегенерацией (Potter, 2008). Тем не менее, эти

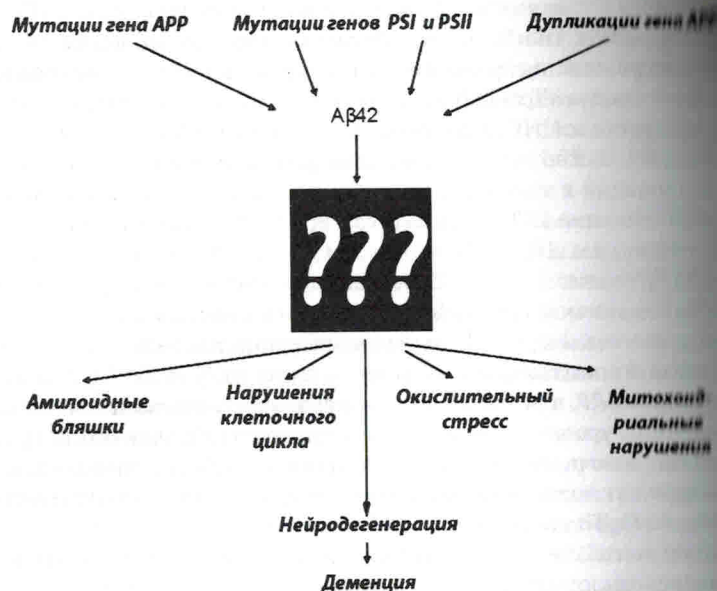


Рис. 38. Схематическое изображение «гипотезы амилоидного каскада». Предполагается, что наблюдаемые аномальные процессы при БА являются побочными по отношению к нейродегенерации, которая, в первую очередь, связана с наличием $A\beta_{42}$ в клетках головного мозга. Основное «звено», тем не менее, неизвестно (частично по Swerdlow, 2007)

данные не являлись окончательными и свидетельствовали о необходимости исследовать хромосомы в клетках головного мозга при БА.

Существует также и другая гипотеза нарушения митотического деления в клетках ЦНС у пациентов с БА. Предполагается, что в областях головного мозга, подверженных дегенерации, наблюдается повышенная частота эндомитозов или эндореplikация, которая приводит к частичной полиплоидизации. Поскольку полиплоидия, как правило, имеет пагубные последствия для физиологии клетки, считается, что её наличие в головном мозге должно вызывать нейродегенерацию (Yang et al., 2001; 2003). Ряд авторов считает, что подобный феномен может быть следствием экспрессии генов-регуляторов митоза у пациентов с БА, которые должны быть инактивированы в постмитотических клетках головного мозга, но по каким-то причинам этого не происходит (Iourov et al., 2006r; 2009b; 2011; Mosch et al., 2007; Thomas Fenech, 2007; Arendt et al., 2009; Yurov et al., 2011). Имеются данные о том, что подобные эпигенетические изменения генома, связанные с инициацией митоза, который так и не достигает завершения, могут быть причиной анеуплоидии в клетках ЦНС (Iourov et al., 2006r; 2009b; 2011; Mosch et al.,

Arendt et al., 2009; Yurov et al., 2011). Эти процессы в определенной степени похожи на те, что происходят в опухолевых клетках, за тем лишь исключением, что клетки пораженного мозга погибают, а не малигнизируются. Не менее, последние данные МЦГ исследований головного мозга не продемонстрировали наличие внутриклеточных маркеров (полиплоидии), которые свидетельствуют о нарушении регуляции клеточного цикла при БА (Yang et al., 2009). Суммируя данные о генетических нарушениях при этом заболевании, можно утверждать, что для изучения механизмов патогенеза необходимо исследовать геном на хромосомном уровне в клетках головного мозга, подверженных и неподверженным дегенерации (Iourov et al., 2011). Соответствующие данные представлены ниже.

4.1. Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при болезни Альцгеймера

Как известно, БА представляет собой наиболее частое и социально значимое психическое заболевание позднего возраста среди нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с геномной (хромосомной) нестабильностью. Увеличение частоты анеуплоидии по хромосоме 21 выявляют в лимфоцитах и фибробластах пациентов, страдающих БА (Miller, Potter, 1999; Migliore et al., 2009). Предполагается, что непосредственная оценка анеуплоидии в клетках головного мозга индивидуумов с БА может определить роль GIN и/или CIN в функциональных нарушениях нейронных, приводящих к нейродегенерации (Yang et al., 2001; Yurov et al., 2009). Последствия анеуплоидии, которая, как предполагается, должна выявляться в тканях мозга при БА, крайне негативны. Уровень CIN (CIN), проявляющийся в виде мозаичной анеуплоидии, может определять структуру клеток головного мозга и их функционирование как при БА, в частности, так и при нейродегенеративных заболеваниях и патологическом старении, в целом. В этом разделе мы говорим про наши исследования — об анализе анеуплоидии в постмортальных клетках мозга при БА, в которых был использован комплекс МЦГ методов, представленный в приложениях. В совокупности, было проанализировано более 500000 клеток образцов головного мозга и определен уровень CIN в постмортальных клетках головного мозга при БА и в контрольной группе (Iourov et al., 2009b).

Используя интерфазную MFISH/QFISH и ICS-MCB, было показано, что в коре головного мозга при БА наблюдается повышенный уровень мозаичной анеуплоидии с вовлечением разных хромосом (рис. 39). Учитывая данные относительно предполагаемой связи трисомии 21 (синдром Дауна) и БА (Geller, Potter, 1999; Potter, 2008; Migliore et al., 2009), а также неоднородность оценки анеуплоидии хромосомы 21 в клетках головного мозга в норме (Rehen et al., 2005), наш особый интерес был к анализу хромосомы 21 в контрольной группе (Iourov et al., 2006r; 2009b; 2011) (табл. 30).

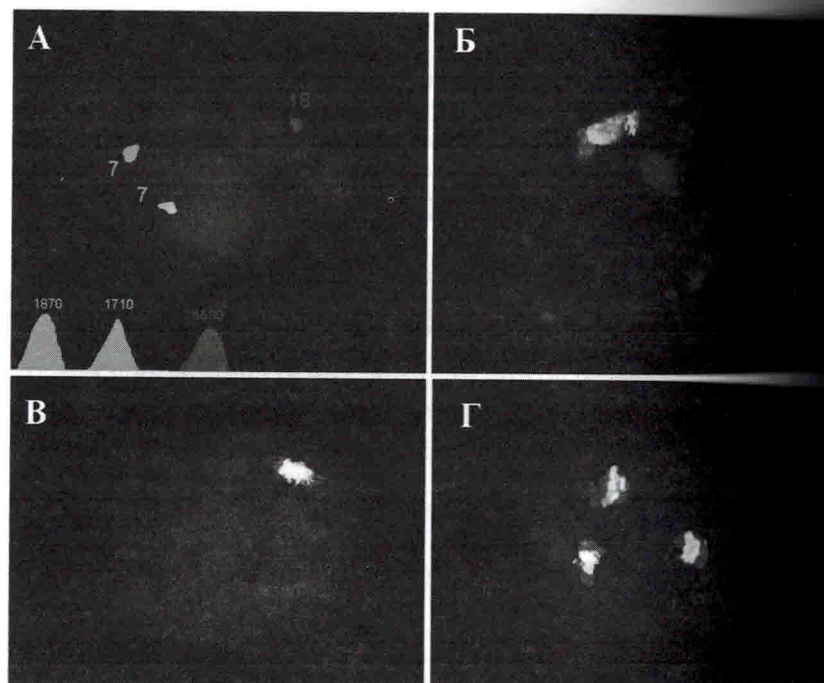


Рис. 39 (см. также на цвет. вкл.). МЦГ исследование клеток головного мозга при БА. (А) Моносомия хромосомы 18, обнаруженная MFISH/QFISH; (Б) Моносомия хромосомы 14, определенная с помощью метода ICS-MCB; (В) Моносомия хромосомы 21, определенная с помощью метода ICS-MCB; (Г) Трисомия хромосомы 21, определенная с помощью метода ICS-MCB (Iourov et al., 2009b)

Кроме этого, было необходимо определить пороговое значение для моносомии, трисомии (тетрасомии) и полиплоидии для последующего изучения БА. При этом, были использованы MFISH с центромерными и сайт-специфичными (хромосомы 13 и 21) ДНК пробками, количественный (QFISH) и пятицветовой FISH анализы, ICS-MCB с оригинальными МЦГ подходами к определению СГВ в неделящихся клетках. FISH анализ был выполнен одновременно для пяти различных хромосом (14000 ядер из 7-ми образцов тканей мозга). Применение сайт-специфичных ДНК проб одиночных или смеси многоцветовых ДНК проб (ДНК пробы на хромосомы 13, 18, 21, X и Y) показало, что частота анеуплоидии по различным хромосомам, включая хромосому 21, варьирует от 0,4 до 0,9% (табл. 31). Дополнительно, было проанализировано 15000 ядер пятицветовой MFISH, в результате ни одной клетки с сочетанной анеуплоидией обнаружено не было, также как и нейронов с тетрасомией. Частота полиплоидии при анализе MFISH хромосом 13, 18, 21, X и Y составляла 0–0,3% в различных

Таблица 30

Частота анеуплоидии в клетках образцов «здорового» мозга контрольной группы, определенная 5-ти цветовой MFISH (ДНК пробы на хромосомы 21 (q22.13-q22.22), 13(q14), 18(D18Z1), X (DXZ1) и Y (DYZ3))

Контроль	Анеуплоидия (уменьшение/добавление), %				
	Хромосома				
Образец, пол	13	18	21	X	Y
мужчина	0,2 (0,2;0,0)	0,4(0,3;0,1)	0,2(0,0;0,2)	0,4(0,0;0,4)	0,4(0,0;0,4)
мужчина	0,0	0,2(0,0;0,2)	0,6(0,4;0,2)	0,5(0,0;0,5)	0,1(0,0;0,1)
женщина	0,6(0,2;0,4)	1,0(0,9;0,1)	0,5(0,3;0,2)	0,1(0,0;0,1)	0,0
женщина	0,8(0,4;0,4)	0,8(0,6;0,2)	0,9(0,6;0,3)	0,8(0,0;0,8)	0,3(0,0;0,3)
женщина	0,9(0,4;0,5)	0,2(0,0;0,2)	0,2(0,0;0,2)	0,4(0,0;0,4)	0,0
мужчина	0,4(0,3;0,1)	0,5(0,1;0,3)	0,3(0,3;0,0)	0,2(0,0;0,2)	0,1(0,0;0,1)
мужчина	0,7(0,1;0,1)	0,9(0,5;0,2)	0,4(0,2;0,2)	0,1(0,0;0,1)	0,1(0,0;0,1)
Средний процент анеуплоидии (SD)	0,5±0,3 (0,2–0,8)	0,6±3 (0,3–0,9)	0,4±0,2 (0,2–0,7)	0,4±0,2 (0,1–0,6)	0,1±0,1 (0,0–0,3)
Пороговое значение (M±1SD)	1,5	1,6	1,2	1,2	0,6

контрольных образцах. Более того, центромерные ДНК пробы на другие хромосомы: 1, 11, 17, 18 и X и пробы для ICS-MCB на хромосомы 1, 7, 14, 21 были также использованы для анализа контрольных образцов, подобранных по полу и возрасту в соответствии с данными относительно пациентов с БА. Анализ был проведен на примерно 250000 клеток, полученных из контрольных образцов, и примерно 250000 клеток, полученных из образцов тканей головного мозга индивидуумов с БА. Было обнаружено, что средняя частота анеуплоидии (моносомии и трисомии) значительно варьируется в зависимости от хромосомы и на межиндивидуальном уровне (Iourov et al., 2009b; 2011) (рис. 40).

В контрольных образцах для БА в возрасте от 76 до 82 лет средний процент анеуплоидии для хромосом 1, 11, 17, 18 и X был между 0,6–1,2% при трехцветовом MFISH исследовании с пороговым уровнем между 1,4–2,6% (табл. 31). При исследовании хромосом 1, 7, 14 и 21 методом ICS-MCB процент анеуплоидии составлял 1,4–2,6% (Iourov et al., 2009b) (с пороговыми уровнями между 2,0–3,8%).

Частота анеуплоидии была определена в образцах аутопсии мозга от больных БА и в контрольных образцах, подобранных по полу и по возрасту, при использовании центромерных ДНК проб на хромосомы