

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПО ТРИМЕСТРАМ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>Джохадзе Т.А., <sup>1</sup>Буадзе Т.Ж., <sup>1</sup>Гаиозишвили М.Н., <sup>2</sup>Мосидзе С.Р., <sup>1</sup>Сигуа Т.Г., <sup>1</sup>Лежава Т.А.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили, кафедра генетики;

<sup>2</sup>Клиника Чачава, Центр репродуктивного здоровья, Тбилиси, Грузия

Беременность женщин протекает на фоне изменений функций всего организма. Находясь под воздействием со стороны плаценты и плода, в организме женщины перестраивается работа ряда систем, включая нейроэндокринную и иммунную системы, изменяется также кровообращение, дыхание, работа почек; происходят своеобразные сдвиги в психике. При этом понятно, что функциональная система мать-плацента-плод находится под генетическом контролем, обеспечивающим своевременное перестраивание функций организма и нормальное течение беременности. Привлекает внимание существование обратной связи, имеющей место быть между управляемыми геномом функциональными сдвигами организма с одной стороны, и тем фактом, что изменение любых физиологических параметров, в свою очередь, отражается на изменчивости функциональных параметров генома.

Период беременности принято делить на три триместра, что связано с изменчивостью событий, характерных для каждого из них, имеется в виду как общее физиологическое состояние, так и картина, отражающая изменчивость показателей периферической крови женщины в течение каждого триместра, белков сыворотки беременных и ряда биохимических показателей [1]. Наблюдаемые по триместрам беременности изменения по указанным параметрам свидетельствуют о различиях в уровне интенсивности синтетических процессов в клетках, что, по всей вероятности, имеет свое отражение в изменчивости тех функциональных параметров генома, которые непосредственно указывают на состояние синтетического аппарата клеток, в частности, речь идет о степени активации рибосомных цистронов, ответственных за синтез рибосомной РНК и, следовательно, за синтез рибосом, обеспечивающих процесс синтеза белков. Известно, что у человека гены, кодирующие рибосомную РНК, локализованы кластерами на спутничных нитях пяти пар акроцентрических хромосом (13,14,15 -D группа и 21,22 -G группа), в интерфазе на их основе происходит формирование ядрышек, поэтому, места их локализации названы ядрышкообразующими районами (ЯОР) хромосом. ЯОР участвуют в протекающих в клетках важнейших молекулярно-генетических процессах, их функциональная активность проявляет зависимость от пола, возраста, от имеющихся патологий. Нестабильность генома (абerrации, фрагильные сайты хромосом) в триместрах беременности, вызывая физиологические изменения в организме, также может способствовать развитию патологий.

Исходя из вышеизложенного, несомненный интерес представляет изучение изменчивости как активации рибосомных цистронов, так и изменчивости состояния общей геномной стабильности (частота хромосомных абerrаций и фрагильных сайтов хромосом) по отдельным триместрам беременности для пополнения информации, касающейся специфических для каждого триместра функциональных сдвигов в работе генома, что и является целью данной работы.

**Материал и методы.** Материалом для исследований послужили клетки митогенстимулированных лимфоцитарных культур периферической крови 15 беременных в возрасте

20-40 лет на разных триместрах беременности с подтвержденным нормальным течением. Изучались изменчивость таких функциональных параметров генома, как общая хромосомная нестабильность с учетом абerrаций и фрагильности хромосом и частота ассоциативной активности акроцентрических хромосом человека, позволяющие судить как об уровне стабильности генома, так и о характере его эпигенетической изменчивости при разных триместрах беременности.

Культивирование лимфоцитов и процедура фиксации проводились по стандартной методике с незначительными модификациями [2], без добавления антибиотиков. Учет частоты структурных мутаций хромосом вели по Международной системе цитогенетической номенклатуры [3]. Для выявления фрагильных сайтов хромосом применяли 5-бромдезоксисуридин, который в концентрации 200 мкг/мл добавляли при культивации лимфоцитов. Определяли фрагильные сайты, в частности – хроматидные и изохроматидные гены, незавершенные хроматидные разрывы, участки вторичных перетяжек [4].

Для идентификации отдельных акроцентрических хромосом проводили дифференциальную окраску по методике G-бендирования. Для этого хромосомы подвергались краткосрочной обработке трипсином с целью удаления белкового компонента, окрашивались красителем Гимза и подвергались карiotипированию с применением системы Ikaros [5].

Статистическая обработка данных включала определение стандартной ошибки к проценту клеток со структурными абerrациями хромосом и клеток с фрагильными сайтами по формуле:

$$m = \pm \frac{\sqrt{n(100-n)}}{N},$$

где – n количество клеток с хромосомными нарушениями, N - количество проанализированных клеток.

Сравнение двух величин проводилось с использованием критерия Стьюдента:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

Для выявления активных ЯОР акроцентрических хромосом и оценки их активности применяли методику серебрения по Bloom и Goodpasture [6]. Ядрышкообразующие участки только тех акроцентрических хромосом, которые активно функционировали в предыдущей интерфазе, выявляются в виде окрашенных серебром (Ag-положительных) сегментов. При анализе вели учет частоты посеребренных сегментов по их размерам. Размеры посеребренных сегментов оценивались по 3-бальной системе: 0 – отсутствие сегмента; 1 – мелкие сегменты (меньше ширины хроматиды); 2 – крупные сегменты (соответствующие или больше ширины хроматиды) [6].

Об ассоциативной активности акроцентрических хромосом судили по количеству клеток с ассоциациями, среднему числу ассоциаций на клетку, частоте участвующих в ассоциациях акроцентрических хромосом D и G групп. При срав-

нении участия в ассоциациях акроцентрических хромосом D и G групп, учитывая нормальную разницу в количестве их наличия, применяли формулу:

$$\frac{P_D - P_G}{\sqrt{\frac{P_D(1-P_D)}{6n} + \frac{P_G(1-P_G)}{4n}}}$$

где  $P_D$  и  $P_G$  - показатели вероятности встречаемости  $Ag^+$ -положительных акроцентрических хромосом, которые вычисляются по формулам:

$$P_D = \frac{m_D}{6n}, \quad P_G = \frac{m_G}{4n},$$

где,  $m$  -  $Ag^+$ -позитивные акроцентрические хромосомы;  $n$  - количество проанализированных клеток.

Достоверность разницы между показателями исследуемой группы и контролем вычислялась по критерию Стьюдента ( $t$ ).

**Результаты и обсуждение.** При изучении функциональных характеристик генома, в первую очередь, проведена оценка состояния его стабильности путем сравнительного учета частоты хромосомных aberrаций как по триместрам беременности, так и в сравнении с контрольной группой клинически здоровых небеременных женщин (рис. 1). По результатам анализа по данному параметру оказалось, что стабильность хромосомного аппарата у беременных сохраняется в течение всех трех триместров беременности – статистически достоверная разница в сравнении с контролем по показателю частоты клеток с хромосомными aberrациями не наблюдалась.

Как уже отмечалось выше, нами изучалась также частота экспрессии фрагильных сайтов хромосом. Фрагильные или ломкие сайты являются участками локализации микросателлитных повторов в хромосомах и разбросаны

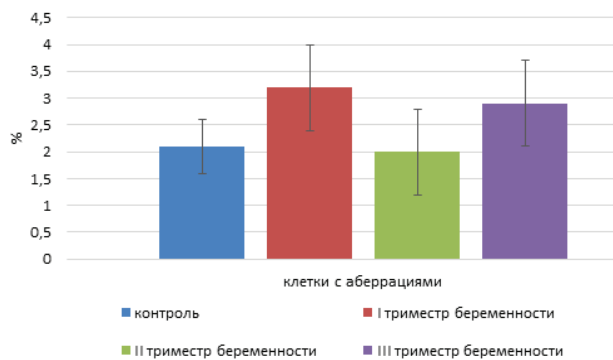


Рис. 1. Частота структурных aberrаций хромосом в клетках культур лимфоцитов беременных женщин на I, II и III триместрах беременности

по всему геному. Их принято делить на общие, присущие геному вообще, и редкие – ассоциированные с разными патологиями. Места их локализации в хромосомах являются наиболее уязвимыми и считаются горячими точками мутагенеза, приводящего, в конечном счете, к мутациям. Тест по изучению фрагильных участков хромосом выбран по причине его информативности, т.к. фрагильные участки проявляются преимущественно в эухроматине хромосом, изменчивость их распределения по хромосомам позволяет судить о перераспределении гетеро- и эухроматиновых участков при разных физиологических сдвигах. Результаты анализа частоты клеток с фрагильными сайтами хромосом отражены на рис. 2.

Оказалось, что частота выявляемости фрагильных сайтов достоверно превышала контрольный уровень только в первом триместре беременности. Изучено распределение фрагильных сайтов по длине хромосом (таблица 1).

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что при всех триместрах беременности фрагильные сайты хромосом с наибольшей частотой выявляются в прицентромерных участках (в контроле – в медиальных), разница между показателями изучаемых групп беременных и контрольной группы высоко достоверна. Возрастание частоты прицентромерных сайтов происходит параллельно достоверно понижению показателей медиальных и теломерных фрагильных сайтов. Как уже отмечалось выше, фрагильные сайты преимущественно выявляются в эухроматиновых участках хромосом, следовательно, выявленная закономерность может свидетельствовать в пользу того, что при всех триместрах беременности наблюдается модификационная изменчивость гетерохроматина, в частности, происходит дегетерохроматинизация прицентромерного и гетерохроматинизация медиальной области и прителомерного гетерохроматина, что, очевидно, является специфическим признаком беременности.

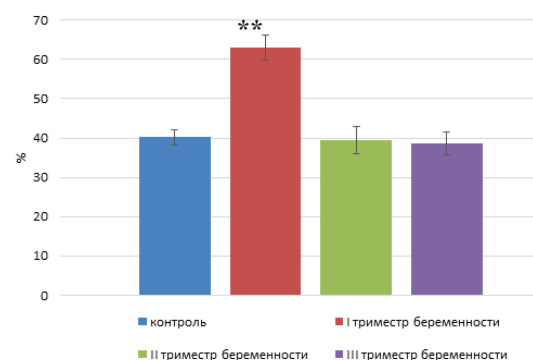


Рис. 2. Частота клеток с фрагильными сайтами хромосом (% от общего количества проанализированных клеток) в клетках культур лимфоцитов на I, II и III триместрах беременности (\*\* -  $p < 0,01$ )

Таблица 1. Частота выявляемости фрагильных сайтов различной локализации (% от общего числа учтенных сайтов) на I, II и III триместрах беременности

Сроки беременности	Локализация фрагильных сайтов на хромосоме				
	Прицентромерная область	Медиальная область	Прителомерная область	На одной хроматиде	На обеих хроматидах
Контроль	20 ± 1,2	75,1 ± 3,4	4,9 ± 0,8	25,8 ± 1,9	74,2 ± 3,2
I триместр	75,6 ± 2,4***	23,3 ± 2,3***	1,1 ± 0,5*	31 ± 3,1	69 ± 3,1
II триместр	65 ± 5**	34 ± 4,8**	1 ± 0,8*	5,8 ± 2,3**	94,2 ± 2,3*
III триместр	71,6 ± 3,3***	27,8 ± 3,3**	0,6 ± 0,4*	14,3 ± 2,6*	85,7 ± 2,6*

\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$

Таблица 2. Интенсивность вступления отдельных акроцентрических хромосом в ассоциации в клетках беременных при I, II и III триместрах беременности

Триместр беременности	Акроцентрические хромосомы				
	13	14	15	21	22
Контроль	0,39±0,02	0,44±0,02	0,28±0,02	0,45±0,02	0,40±0,02
I триместр	0,39±0,04	0,38±0,04	0,31±0,04	0,49±0,05	0,41±0,04
II триместр	0,35±0,05	0,34±0,05	0,39±0,05	0,53±0,05	0,38±0,05
III триместр	0,39±0,06	0,30±0,05	0,40±0,06*	0,55±0,07	0,34±0,05

\* - разница с контролем достоверна  $p < 0,05$

Для получения информации об интенсивности протекающих синтетических процессов в клетках беременных по триместрам проведено изучение частоты ассоциаций акроцентрических хромосом, а также интенсивности вступления акроцентриков в ассоциации. Акроцентрические хромосомы обладают способностью сближаться друг с другом областью спутничных нитей и вступать в т.н. спутничные ассоциации, что также является признаком активации содержащихся в них рибосомных генов. Частота активных ЯОР и спутничных ассоциаций – два взаимозависимых параметра, позволяющих судить об активации рибосомных генов, следовательно, об уровне синтетических процессов [5,6].

Результаты анализа частоты ассоциации на клетку обобщены на рис. 3. Оказалось, что суммарная частота ассоциации акроцентрических хромосом на всех триместрах достоверно значимо превышала контрольный показатель ( $p < 0.001$ ), что происходило за счет возрастания частоты одно-балльных Ag-положительных ЯОР, их частота пропорционально увеличилась на хромосомах D и G групп. Что касается частоты 2-балльных Ag-положительных ЯОР, достоверная разница между контролем и показателями, полученными по триместрам беременности, не зафиксирована.

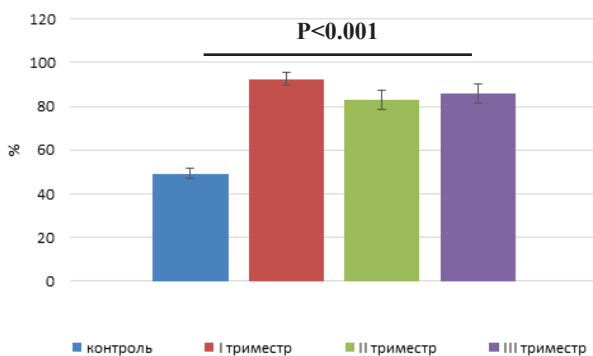


Рис. 3. Частота метафаз с ассоциациями хромосом (% от общего количества метафаз) на I, II и III триместрах беременности ( $p < 0.001$ )

О дегетерохроматинизации спутничных нитей акроцентрических хромосом при всех триместрах беременности свидетельствуют и данные анализа ассоциативной активности акроцентрических хромосом, в частности частота клеток с ассоциациями акроцентриков достоверно значимо возрастает по всем триместрам беременности, однако, между триместрами фактически не различается (рис. 3).

Выявленная в ходе исследования повышенная частота как активных ЯОР акроцентрических хромосом, так и возрастание их ассоциативной активности при всех триместрах беременности свидетельствует о более высоком

уровне протекания синтетических процессов в клетках беременных.

Интересная картина выявилась при изучении ассоциативной активности отдельных акроцентрических хромосом по триместрам.

Следует отметить, что достоверная разница по показателям ассоциативности всех 5 пар акроцентрических хромосом между триместрами не выявлена. Не проявилась разница и в сравнении с контрольным показателем ассоциативности для 13, 14, 21 и 22 пар хромосом. Однако для 15 хромосомы наблюдалось статистически значимое в сравнении с контролем возрастание интенсивности вступления в ассоциации ( $p < 0,05$ ), что отмечалось только на третьем триместре беременности и, по всей вероятности, может считаться специфическим для данного триместра геномным параметром (таблица 2). Интересно, что 15 хромосома в норме характеризуется наименьшей ассоциативной активностью в сравнении с другими акроцентриками, однако, как свидетельствуют данные литературы, ее активность может специфически возрастать при некоторых патологических процессах [5].

В заключение следует отметить, что при всех трех триместрах нормально протекающей беременности стабильность генома сохраняется, о чем свидетельствуют данные учета хромосомных нарушений, частота которых не увеличивается. Вместе с тем, наблюдается и некоторая модификационная изменчивость геномных параметров, в частности происходит специфическая изменчивость генома – дегетерохроматинизация прицентромерного и гетерохроматинизация медиальной области и прителомерного гетерохроматина.

Суммарная частота выявляемости одно-балльных Ag-положительных ЯОР при всех триместрах беременности достоверно превышала контрольный показатель ( $p < 0.001$ ), что указывает на возрастание уровня протекающих в клетках синтетических процессов при беременности. Однако достоверные различия между триместрами по данному показателю не отмечаются. Следует отметить, что значимая разница по показателям ассоциативности для 13,14, 21 и 22 пар хромосом также не выявлена. Однако, на III триместре беременности для 15 хромосомы наблюдалось статистически значимое в сравнении с контролем возрастание интенсивности вступления в ассоциации ( $p < 0,05$ ), что, очевидно, может считаться специфическим геномным параметром для данного триместра. Полученные результаты могут быть индикатором нормального течения беременности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Pardoan A. Laboratory Tests to Monitoring Physiological Pregnancy. J Lab Precis Med. 2020,5,7,1-9.

2. Lezhava, T. Human Chromosomes and Aging: from 80 to 114 Years. Nova Science Publisher, New York, 2006, -177.
3. ISCN. As International System for Human Cytogenetics Nomenclature 1985, Karger, Basel.
4. Jokhadze T., Monaselidze J., Nemsadze G., et al. The Study of Genomic Variability in Patients with Ductal form of Breast Cancer and the Possibility of Correction the Peptide Bioregulator and Metal Ions. Georgian Medical News, 2017, 1, (262), 88-92.
5. Lezhava, T., Buadze T., Mikaiia N., et al. Epigenetics Activation of Ribosomal Cistrons in Chromatids of Acrocentric Chromosome 15 in Lung Cancer. Cytology and Genetics 2021, 41(9), 491-497.
6. Lezhava, T., Buadze T., Monaselidze J., et al. Epigenetic Changes of Activity of the Ribosomal Cistrons of Human Acrocentric Chromatids in Fetuses, Middle-aged (22-45 years) and Old Individuals (80-106 years). Cytology and Genetics 2020, 54 :233-242.

## SUMMARY

### GENOMIC VARIABILITY DURING PREGNANCY TRIMESTERS

<sup>1</sup>Jokhadze T., <sup>1</sup>Buadze T., <sup>1</sup>Gaiozishvili M., <sup>2</sup>Mosidze S., <sup>1</sup>Sigua T., <sup>1</sup>Lezhava T.

<sup>1</sup>Iv. Javakishvili Tbilisi State University, Department of Genetics; <sup>2</sup>Chachava Clinic, Reproductive Health Center, Tbilisi, Georgia

The article presents data on the genome status of pregnant women in different trimesters of pregnancy, during the normal course of pregnancy. The variability of ribosomal cistron activation as well as the variability of genome stability (frequencies of chromosomal aberrations and fragile sites) in different trimesters of pregnancy have been studied to detect genome-specific functional variability for each trimester.

It was found that the level of genome stability determined by the frequency of chromosomal structural disorders and fragile sites in all three trimesters of pregnancy did not differ significantly from similar rates for non-pregnant healthy women. The exception was the frequency of fragile sites in the first trimester of pregnancy, which was statistically significantly higher than the control rate, which may be a specific feature (characteristic) for this trimester of pregnancy.

At the same time, specific variability in genomic parameters was identified. In particular, deheterochromatization of pericentromeric heterochromatin and heterochromatinization of the medial region and pretelomeric heterochromatin.

Based on data on the activation of Nucleolar organizing regions of acrocentric chromosomes and changes in the frequency of acrocentric chromosome associations, which are statistically significantly higher than the control level, a conclusion is made about increased activity of protein-synthesizing apparatus of the cell in all three trimesters of pregnancy.

A statistically significant increase in the associative activity of the 15 acrocentric chromosome in the third trimester of pregnancy has been identified, which may also indicate possible specific modification variability on this chromosome and be characteristic of a given trimester of pregnancy.

**Keywords:** pregnancy, chromosomal aberrations, trimester of pregnancy, heterochromatization, 15 acrocentric chromosome.

## РЕЗЮМЕ

### ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПО ТРИМЕСТРАМ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>Джохадзе Т.А., <sup>1</sup>Буадзе Т.Ж., <sup>1</sup>Гаиозишвили М.Н., <sup>2</sup>Мосидзе С.Р., <sup>1</sup>Сигуа Т.Г., <sup>1</sup>Лежава Т.А.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили, кафедра генетики; <sup>2</sup>Клиника Чачава, Центр репродуктивного здоровья, Тбилиси, Грузия

В статье представлены данные о состоянии генома беременных на разных триместрах при нормальном течении беременности. Изучена вариабельность как активации рибосомных цистронов, так и вариабельность состояния геномной стабильности (частота хромосомных aberrаций и фрагильных сайтов) на отдельных триместрах беременности с целью выявления функциональных сдвигов в геноме, специфичных для каждого триместра.

Показано, что уровень стабильности генома, определяемый структурными aberrациями хромосом и частотой фрагильных сайтов, во всех трех триместрах беременности существенно не отличается от уровня аналогичного показателя у здоровых небеременных женщин. Единственным исключением является показатель частоты фрагильных сайтов в первом триместре беременности, который статистически значимо выше, чем контрольный показатель, что, по всей вероятности, является специфической особенностью этого триместра беременности.

Определена специфическая вариабельность генома, в частности дегетерохроматизация перичентромерного гетерохроматина и гетерохроматизация медиальной области и прителомерного гетерохроматина.

На основании данных об изменчивости активации ядрышкообразующих районов и частоты ассоциаций акроцентрических хромосом, статистически значимо превышающих контрольный уровень, делается вывод о повышенной активности белоксинтезирующего аппарата клеток при всех триместрах беременности.

Выявлена значительная ассоциативная активность 15 акроцентрической хромосомы в третьем триместре беременности, что указывает на возможную специфическую модификацию, характерную для данного триместра беременности.

Полученные результаты являются индикатором нормального течения беременности.

## რეზიუმე

გენომის ცვალებადობა ფეხმძიმობის ტრიმესტრების მიხედვით

<sup>1</sup>თ.ჯოხაძე, <sup>1</sup>თ.ბუაძე, <sup>1</sup>მ.გაიოზიშვილი, <sup>2</sup>ს.მოსიძე, <sup>1</sup>თ.სიგუა, <sup>1</sup>თ.ლეჟავა

<sup>1</sup>ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, გენეტიკის კათედრა; <sup>2</sup>ზაჩავას კლინიკა, რეპროდუქციული ჯანმრთელობის ცენტრი, თბილისი, საქართველო

სტატიაში წარმოდგენილია მონაცემები ორსული ქალების გენომის მდგომარეობის შესახებ ორსულ

ბის სხვადასხვა ტრიმესტრში, ორსულობის ნორმალური მიმდინარეობისას. შესწავლილია როგორც რიბოსომული ცისტრონების აქტივაციის, ისე გენომის სტაბილურობის ვარიანტობა (ქრომოსომული აბერაციებისა და ფრაგილური საიტების სისწირეები) ორსულობის სხვადასხვა ტრიმესტრში, თითოეული ტრიმესტრისათვის გენომის სპეციფიკური ფუნქციური ცვალებადობის გამოვლენის მიზნით.

აღმოჩნდა, რომ ქრომოსომა სტრუქტურული დარღვევებისა და ფრაგილური საიტების სისწირის მიხედვით განსაზღვრული გენომის სტაბილურობის დონე ორსულობის სამივე ტრიმესტრში მნიშვნელოვნად არ განსხვავდება არაორსული ჯანმრთელი ქალების ანალოგიური მაჩვენებლებისაგან. გამონაკლისს წარმოადგენს ფრაგილური საიტების სისწირის მაჩვენებელი ორსულობის პირველ ტრიმესტრში, რომელიც სტატისტიკურად მნიშვნელოვნად უფრო მაღალია, ვიდრე საკონტროლო მაჩვენებელი, რაც ორსულობის ამ ტრიმესტრისათვის შეიძლება იყოს სპეციფიკური თავისებურება (მახასიათებელი).

ამავდროულად, გამოიკვეთა გენომური პარამეტრების სპეციფიკური ვარიანტობა. კერძოდ, პერიცენტრომერული ჰეტეროქრომატინის დეჰეტეროქრომატინიზაცია და მედიალური და ტელომერასთან მიმდებარის - ჰეტეროქრომატინიზაცია.

აკროცენტრულ ქრომოსომათა ბირთვაკარმომქმნელი რაიონების აქტივაციისა და აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციების სისწირის მონაცემების საფუძველზე, რომლებიც სტატისტიკურად სარწმუნოდ აღემატებიან საკონტროლო დონეს, გამოტანილია დასკვნა ორსულობის სამივე ტრიმესტრში უჯრედების ცილამასინთეზირებელი აპარატის გაზრდილი აქტივობის შესახებ.

გამოვლენილია მე-15 აკროცენტრული ქრომოსომის ასოციაციური აქტივობის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი ზრდა ორსულობის მესამე ტრიმესტრში, რაც, შესაძლოა მიუთითებდეს სპეციფიკურ მოდიფიკაციურ ცვალებადობაზე და დამახასიათებელია ორსულობის მოცემული ტრიმესტრისათვის. მიღებული შედეგები დასაშვებია წარმოადგენდეს ორსულობის ნორმალური მიმდინარეობის ინდიკატორს.

\* \* \*