

© И.Л. Трофимова^{1,2},

Е.В. Евдокименко²,

Т.В. Кузнецова^{1,2}

¹ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта»

СЗО РАМН

²Санкт-Петербургский государственный

университет

ОСОБЕННОСТИ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ЦИТОТРОФОБЛАСТА ХОРИОНА У ЭМБРИОНОВ ПЕРВОГО ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ

УДК: : 618.39-089.888.14:612.646]-07:575

■ Изучены особенности митотической активности ворсин цитотрофобласта хориона I триместра при нормальной и неразвивающейся беременности. Показано, что в условиях *in vitro* способность к пролиферации клеток цитотрофобласта из хориона при неразвивающейся беременности повышается. Использование полупрямого метода приготовления препаратов хромосом с инкубированием образцов хориона в течение 24–72 ч может повысить результативность и разрешающую способность цитогенетической диагностики при анализе причин неразвивающейся беременности. Обнаружены необычные особенности организации и репликации прицентромерных ГХР хромосом 1, 9 и 16.

■ **Ключевые слова:** цитотрофобласт хориона; митотический индекс; пролиферативная активность; гетерохроматиновые районы.

Введение

Цитотрофобласт ворсинчатого хориона (ЦТБ) представляет собой камбиальный слой синцитиотрофобласта и обладает высокой спонтанной митотической активностью. Известно, что пролиферативная активность клеток ЦТБ хориона достигает максимума в первом триместре и постепенно снижается по мере прогрессирования беременности [1; 16]. Одним из подходов к анализу пролиферации клеток является определение митотического индекса (МИ), величина которого характеризует долю клеток, находящихся в митозе [6]. Эти исследования можно дополнить путем определения общей продолжительности клеточного цикла (КЦ). Данные, полученные в экспериментах по изучению общей продолжительности КЦ и отдельных его фаз, а также МИ в клетках ЦТБ человека, скудны и противоречивы [2; 3; 30; 24; 40]. Кроме того, в работах, посвященных анализу особенностей пролиферации ЦТБ хориона, отсутствует четкое разделение исследуемого материала на образцы, полученные от эмбрионов при физиологически нормальной или неразвивающейся беременности.

При этом известно, что нарушения пролиферации и дифференцировки клеток цитотрофобласта могут приводить не только к функциональной недостаточности плаценты, расстройствам трофики и дыхания, но и к остановке развития плода. Поэтому особый интерес представляет исследование спонтанной митотической активности клеток ЦТБ хориона при физиологически нормальной и неразвивающейся беременности.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ особенностей митотической активности клеток цитотрофобласта хориона человека в I триместре при нормальной и неразвивающейся беременности.

Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы ворсинчатого хориона, полученные после прерывания беременности в срок 5/6–10 недель по медицинским показаниям (диагноз «неразвивающаяся беременность», группа НБ, 8 образцов) и по желанию женщины (группа ФБ, физиологическая беременность, 6 образцов).

Продолжительность КЦ оценивали методом «меченых» митозов (Епифанова, 2003), используя в качестве аналога азотистого основания 5-бромдезоксисуридин (БДУ). Образцы ворсин хориона инкубировали в среде RPMI 1640 («Биолот») с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки («Биолот») и БДУ (конечная концентрация 10–15 мкг/мл) в течение 24, 48 и 72 ч. По окончании времени инкубации готовили препараты метафазных хромосом как описано в [14].

В качестве контроля использовали препараты, приготовленные из ворсин, инкубированных в среде, не содержащей БДУ, а также из ворсин, не подвергавшихся предварительному инкубированию [1].

Препараты окрашивали 0,01% акридиновым оранжевым (АО), приготовленным на натрий-фосфатном буфере (рН=7,0), либо проводили иммуноцитохимическую детекцию БДУ с помощью моноклональных антител [1].

Принадлежность метафазной пластинки к первой, второй или третьей генерации (т. е. прохождение клетками одного, двух или трех циклов репликации ДНК) определяли по дифференциальной окраске сестринских хроматид [15; 34].

Анализ препаратов проводили на микроскопе LEICA DMLS, оборудованного цветной камерой Leica DFC320, блоком светофильтров I3 и программным обеспечением для анализа изображений.

МИ рассчитывали по формуле:

$$(1) \text{ МИ} = (\text{количество митозов} / 10000 \text{ ядер}) \times 100\%$$

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «In Start Graph Pad Prism» и формул [4].

Результаты и обсуждение

Массовые исследования спонтанных абортос показали ограниченные возможности традиционного цитогенетического анализа, обусловленные трудностями культивирования клеток из тканей абортосов, подвергшихся аутолизу [9; 10], или отсутствием спонтанных митозов в ЦТБ хориона [17]. Использование полупрямого метода приготовления препаратов (то есть после непродолжительного инкубирования ворсин хориона в питательной среде) зачастую оказывается неэффективным. Как и при прямом методе (исключающем этап культивирования) число делящихся клеток в ЦТБ, пригодных для хромосомного анализа, редко достигает уровня, предъявляемого к препаратам из клеточных культур [1]. Согласно международным стандартам [21], уровень успешных цитогенетических исследований ворсин хориона при прямом методе составляет 90%, а продуктов зачатия и частей плода материала — 60%. Учитывая актуальность цитогенетического анализа при неразвивающейся беременности, нами было предпринято сравнительное исследование митотического потенциала клеток ЦТБ в образцах хориона в группах НБ и ФБ.

Информацию о вступлении клеток в деление получали, регистрируя митозы с «мечеными» хромосомами через различные промежутки времени после однократного введения БДУ при постановке клеточной культуры [7].

Идентификацию «меченых» митозов проводили с помощью окраски АО, при которой участок хромосомы, включивший БДУ, флуоресцирует в красной области спектра, не включивший — в желто-зеленой. После одного раунда репликации ДНК в присутствии БДУ плечи всех хромосом окрашиваются равномерно в желто-зеленый цвет, а для хромосом 1, 9, 16, акроцентрических хромосом и длинного плеча Y-хромосомы характерна ассиметричная латеральная окраска гетерохроматиновых районов (ГХР) [15]. После двух раундов репликации отмечается дифференциальная окраска сестринских хроматид и сестринские хроматидные обмены (СХО), после трех — хромосомы с сестринскими хроматидами трех типов (с одинаковой и с дифференциальной окраской, а также с СХО) [34].

Однако в собственных экспериментах в ГХР хромосом 1, 9, 16 и Y мы наблюдали одинаковую красную флуоресценцию АО на обеих сестринских хроматидах независимо от времени инкубирования образца (рис. 1 а), что не позволяло идентифицировать метафазы после одного раунда репликации ДНК. Следует отметить, что и после двух раундов репликации одновременно с дифференциальной окраской сестринских хроматид мы также обнаружили необычную красную флуоресценцию ГХР (рис. 1 б). Данный факт, по-видимому, обусловлен особой организацией ГХР в ЦТБ.

Поэтому для определения метафаз после одного раунда репликации, использовали иммуноцитохимический метод детекции БДУ с помощью специфических антител [38; 39]. Исходя из красной флуоресценции ГХР при окрашивании препаратов АО, мы ожидали, что сайты включения антител будут более представлены в районах 1qh, 9qh, 16qh и Yqh. Однако только в 2 из 119 проанализированных метафаз в обеих группах, независимо от времени инкубирования образцов, хромосомы полностью прошли один раунд репликации (рис. 2). Также были зарегистрированы метафазные пластинки, окраска хромосом в которых указывала, что на момент добавления БДУ они находились во второй половине S-фазы. При этом в 6 из 10 метафаз не было зарегистрировано сигнала антител в ГХР (рис. 3), что можно объяснить асинхронной репликацией гомологов при более раннем начале репликации одного из них. Возможно, к моменту добавления БДУ репликация гомологичных ГХР уже была завершена. Как было показано [19], C-блоки хромосом имеют как минимум два подтипа поздне-реплицирующегося ГХ. Один из этих подтипов начинает репликацию раньше, а второй подтип — самым последним, завершая репликацию всего генома. Кроме

того, в ранние сроки беременности репликация ГХР хромосом в ЦТБ может происходить одновременно с некоторыми R-сегментами хромосом, то есть в первой половине S-фазы [12]. Ранняя репликация ГХ показана также у дрожжей [31], дрозофилы [28], мыши [37].

Особый интерес представляли метафазные пластинки, в которых отсутствовал сигнал антител к БДУ в ГХ районах хромосом 1, 9, 16 при относительно равномерном распределении сигнала по плечам всех хромосом, что свидетельствует о прохождении клеткой одного полного раунда репликации (рис. 4). О том, что это явление не является методическим артефактом, свидетельствует отсутствие сигнала на 3 из 4 ядер (рис. 3) и на 2 из 3 ядер (рис. 4), очевидно находящихся в стадии покоя.

Известно, что метод иммуноцитохимической детекции БДУ имеет ограничение, связанное с различной доступностью хроматина для антител после денатурации ДНК [23; 22]. Структура хроматина, в свою очередь, может зависеть и от того, на какой стадии S фазы (поздней или ранней) БДУ был доступен для клеток [22]. Причиной отсутствия сигнала может быть также недорепликация ГХ, которая описана для интеркалярного ГХ политенных хромосом, образующихся вследствие нескольких раундов репликации без вступления клетки в митоз, у дрозофилы. Возможно, что недорепликация прицентромерного ГХ и, как следствие — эндомитоз — является одним из механизмов полиплоидизации, которая регулярно происходит в клетках трофобласта у млекопитающих и человека [8; 27]. Это предположение подтверждается относительно частой регистрацией эндомитозов при рутинном цитогенетическом анализе клеток ЦТБ при нормальной и неразвивающейся беременности [1]. Известно также, что в случае незавершения репликации клетка может вступить в апоптоз, что также характерно для клеток ЦТБ хориона. Однако связано ли наблюдаемое нами в некоторых клетках явление с ранней репликацией или недорепликацией ГХР хромосом 1, 9, 16, либо с недоступностью участков, содержащих БДУ, для антител, остается неясным.

Таким образом, ни с помощью АО, ни моноклональных антител к БДУ нам не удалось четко идентифицировать метафазы, хромосомы в которых завершили один раунд репликации и вступили во второе деление.

Исходя из предположения, что митотический потенциал клеток ЦТБ может снижаться при НБ, мы провели сравнительный анализ числа клеток, прошедших 2 раунда репликации (табл. 1). Частота клеток, прошедших 2 раунда реплика-

ции, варьировала в широких пределах во всех образцах (табл. 1). Эта варибельность обусловлена, в первую очередь, гетерогенностью клеточной популяции [29; 32]. Следует отметить, что при проведении экспериментов в работе нами не были использованы синхронизирующие агенты, поэтому клетки ЦТБ в момент добавления БДУ находились на разных стадиях клеточного цикла. Кроме того, известно, что митотическая активность клеток хориона в различных ворсинах неодинакова. Межиндивидуальная варибельность в обеих исследованных группах также может быть обусловлена особенностями кариотипа [11; 5; 9; 10; 13], сроками беременности и стадией, на которой произошла остановка развития [3].

Несмотря на существенные отличия в частоте «меченых» митозов в пределах группы, обращала на себя внимание тенденция к задержке вступления клеток в митоз в группе НБ. Так, после 24-часовой инкубации встречались единичные метафазные пластинки 2-й генерации только в группе ФБ ($3,1 \pm 3,1\%$). При увеличении времени инкубирования до 48 ч. две S-фазы прошли $36,1 \pm 16,0\%$ клеток в группе ФБ по сравнению с $10,5 \pm 4,2\%$ в группе НБ. Возможно, это связано с нарушением параметров КЦ после «шока», который испытывают клетки ЦТБ в момент биопсии хориона [1], и для вступления клеток в митоз необходим некий «лаг-период». Для ЦТБ группы ФБ он, по-видимому, короче, чем для группы НБ.

Вместе с тем, на сохранение пролиферативной активности клеток ЦТБ в условиях *in vitro* указывает значительный прирост клеток 2-й генерации при увеличении времени инкубации до 72 ч. — в 1,5 раза в группе ФБ и в 5 раз в группе НБ. При этом различия между группами существенно нивелируются (табл. 1). С одной стороны не наблюдается значительного повышения доли клеток 2-й генерации в образцах группы ФБ, что можно было ожидать, ориентируясь на результаты инкубации в течение 48 ч; с другой стороны наблюдается рост митотической активности ЦТБ в группе НБ. Следует отметить, что нами ни в одном случае не было зарегистрировано клеток 3-й генерации. Незначительное число таких метафаз было обнаружено и в аналогичных исследованиях [40]. Эти результаты свидетельствуют о «лимите деления», т. е. ограниченном числе циклов, которое проходит клетка в условиях *in vitro*. Согласно полученным данным, этот лимит не превышает 2–3 последовательных циклов. По-видимому, ограниченное число делений в условиях *in vitro* является характерным для клеток ЦТБ не только в условиях органной культуры. В первичных клеточных культурах

Таблица 1

Частота метафазных пластинок 2-й генерации (в %) в цитотрофобласте из образцов хориона при физиологической и неразвивающейся беременности

№ образца	Кариотип	Срок развития (неделя)	Продолжительность культивирования в присутствии с БДУ, ч		
			24	48	72
Группа НБ					
1	46, ХУ	Раннего срока	0 (0/28)	33,3 (4/12)	62,5 (5/8)
2	92, ХХУУ	5/6	0 (0/22)	20,0 (6/30)	44,4 (12/27)
3	46, ХХ	7	0 (0/14)	12,0 (3/25)	58,3 (7/12)
4	47, ХУ,+15	7/8	0 (0/37)	13,8 (4/29)	61,1 (22/36)
5	47, ХХ,+9	7/8	0 (0/28)	0 (0/25)	60,0 (18/30)
6	46, ХХ	8/9	0 (0/33)	4,5 (2/44)	29,6 (8/27)
7	69, ХХХ	8/9	0 (0/15)	0 (0/20)	45,0 (9/20)
8	47, ХХ,+9	8/9	0 (0/9)	0 (0/13)	25,0 (3/12)
Среднее ± ошибка среднего			0 ± 0	10,5 ± 4,2	48,2 ± 5,2
Группа ФБ					
1	46, ХУ	5/6	0 (0/13)	95,6 (22/23)	70,8 (17/24)
2	46, ХХ	6	0 (0/28)	74,2 (23/31)	91,3 (21/23)
3	46, ХХ	6/7	0 (0/31)	23,1 (6/26)	31,8 (7/22)
4	46, ХУ	7	18,5 (5/27)	7,1 (2/28)	40,0 (10/25)
5	46, ХХ	9	0 (0/28)	16,6 (2/12)	42,8 (6/14)
6	46, ХУ	9/10	0 (0/10)	0 (0/23)	54,5 (12/22)
Среднее ± ошибка среднего			3,1 ± 3,1	36,1 ± 16,0	55,2 ± 9,1

клетки трофобласта также быстро утрачивают способность к митотическому делению, вступают в апоптоз или дифференцируются [26]. В условиях *in vivo* клетки в тканях организма после выхода из цикла как после окончания митоза, так и по завершению синтеза ДНК в S-фазе, могут вступить в состояние пролиферативного покоя [7]. Особое значение это состояние имеет для стволовых клеток, в том числе и стволовых клеток ворсинчатого ЦТБ, которые на протяжении всей беременности обладают способностью к самоподдержанию и сохраняют возможность дифференцироваться в функционально специализированные клетки [18; 29]. Наиболее высокой митотической активностью обладают клетки ЦТБ, которые концентрируются на вершинах и в местах ветвления ворсин, образуя так называемые «клеточные столбики» [32].

Смена периодов покоя и активной пролиферации клеток является основой координированного роста и регуляции численности и размеров клеточных популяций в пределах ткани и органа. При этом для вступления клеток, находящихся в состоянии пролиферативного покоя, необходимы определенные стимулы [7]. Адекватными подходами для оценки влияния различных факторов на митотическую активность клеток в клеточной популяции могут служить гистохимические методы с использованием антител

к белкам-маркерам пролиферации и апоптоза, а также определение МИ на цитогенетических препаратах. Поэтому на следующем этапе данной работы мы провели сравнительный анализ величины МИ в нативных и инкубированных при различных условиях образцах хориона.

Как видно из данных представленных в таблице 2, величина МИ в нативных образцах хориона в обеих группах существенно варьирует независимо от срока развития, а также наличия и типа аномалии кариотипа в ЦТБ. Основной причиной этой вариабельности является, по-видимому, различная интенсивность роста и рамификации ворсин [32]. Большинство исследователей сходятся во мнении, что степень васкуляризации, наличие терминальных ворсин и другие особенности строения хориона, не коррелируют с величиной митотического индекса на «прямых» препаратах из ворсин хориона [36; 33].

Как и другие авторы [2; 24], мы обратили внимание на тенденцию к увеличению частоты митозов в условиях *in vitro* в большинстве образцов (табл. 2). Как было показано, на пролиферацию ЦТБ в условиях *in vitro* могут влиять такие факторы, как продолжительность инкубирования образца [2; 24], концентрация кислорода и эмбриональной телячьей сыворотки [25; 24]. Известно также, что наличие в питательной среде БДУ может изменять общую продолжительность КЦ

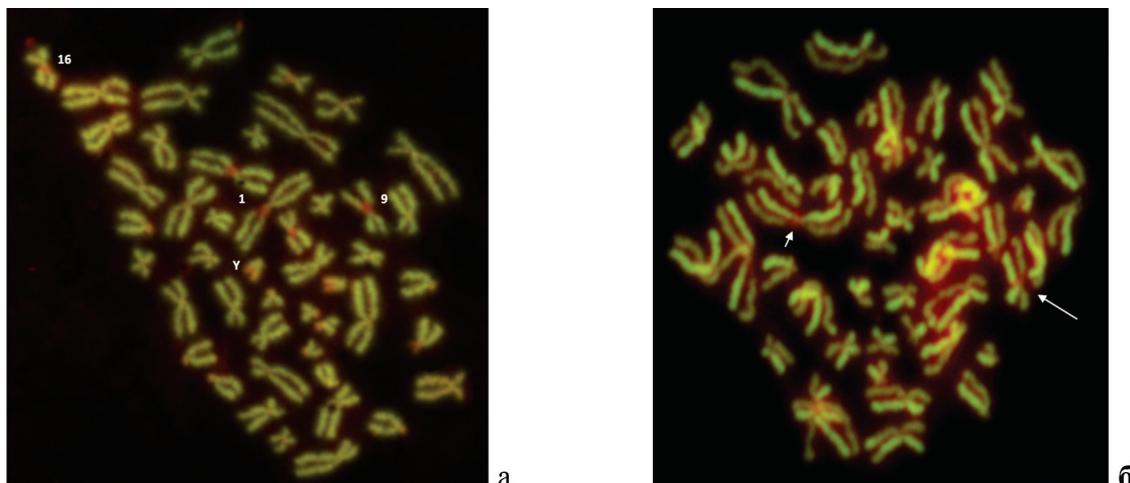


Рис. 1. Метафазные пластинки из цитотрофобласта хориона, инкубирование образца хориона в присутствии бромдезоксигуанидина в течение 24 час (а) и 48 час (б). Окраска 0,01%-м акридиновым оранжевым

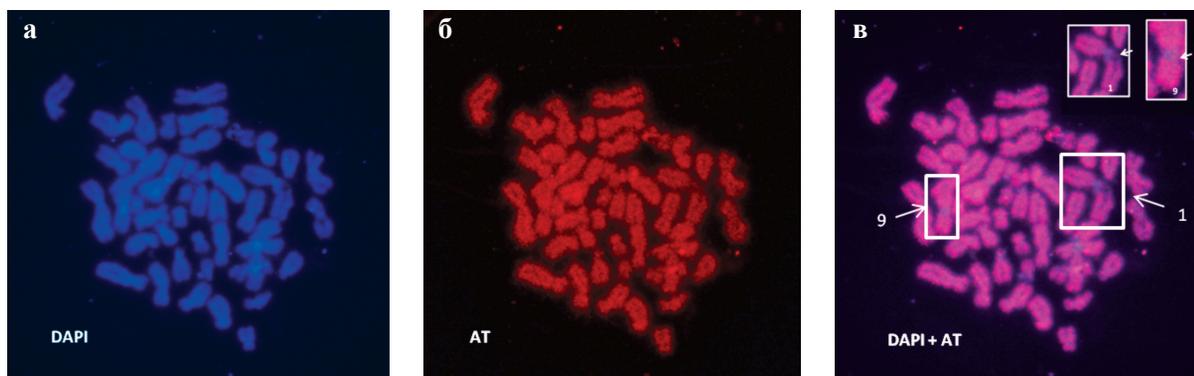


Рис. 2. Метафазная пластинка из клетки цитотрофобласта хориона. Окраска DAPI (а), иммунофлуоресцентная детекция БДУ после его включения в течение одной S-фазы (б), совмещение изображений (в)

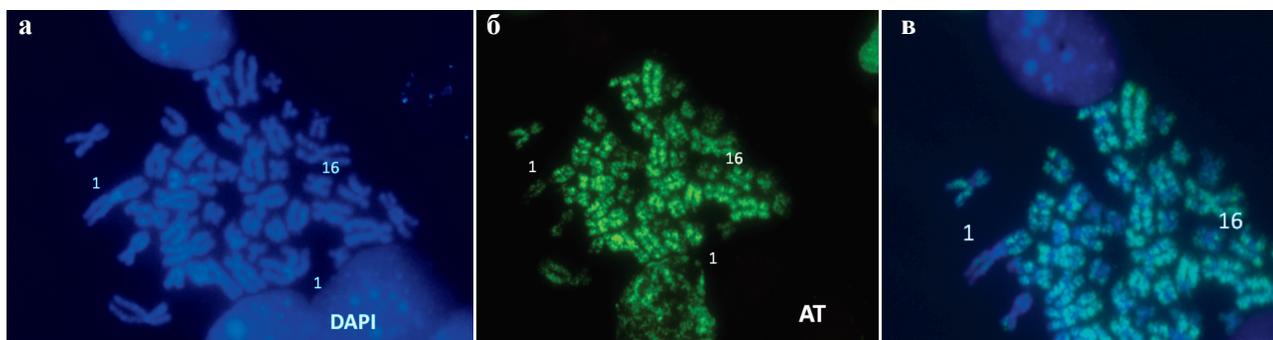


Рис. 3. Метафазная пластинка из клетки цитотрофобласта хориона. Окраска DAPI (а), иммунофлуоресцентная детекция БДУ после его включения во второй половине S-фазы (б), совмещение изображений (в)

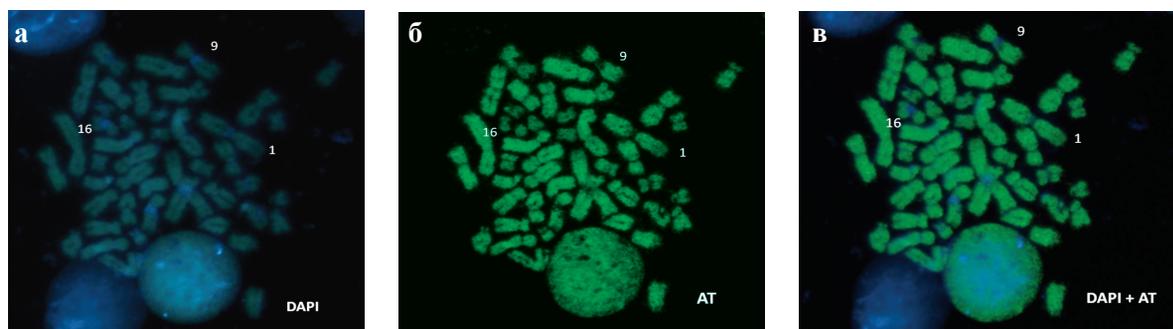


Рис. 4. Метафазная пластинка из клетки цитотрофобласта хориона. Окраска DAPI (а), иммунофлуоресцентная детекция БДУ после его включения в течение одной S-фазы. Отсутствие флуоресцентных сигналов антител к БДУ в ГРХ хромосом 1, 9 и 16

Таблица 2

Митотический индекс (в %) на препаратах, приготовленных прямым и полупрямыми методами после различных условий культивирования, из образцов ворсинчатого хориона при физиологической и неразвивающейся беременности

№	Коэф. регрессии	Коэф. Стьюдента	Без культивирования	Инкубация без БДУ, час			Инкубация с БДУ, час		
				24	48	72	24	48	72
Образцы ЦТБ группы НБ									
1	0,00198	3,486	0,06	0,59	0,37	0,41	0,49	0,06	0,18
2	0,01725	0,5811	0,29	0,17	0,44	0,48	0,27	0,42	0,21
3	0,5223	1,861	0,25	0,49	0,16	0,05	0,50	0,41	0,50
4	0,8455	0,3153	0,28	0,79	1,04	0,51	0,62	0,77	0,79
5	0,1056	3,780	0,20	0,21	0,29	0,19	0,27	0,39	0,23
6	0,01750	0,5498	0,19	0,66	0,59	0,25	0,61	0,79	0,23
7	0,1761	1,249	0,30	0,77	0,41	0,19	0,49	0,23	0,26
8	0,7708	0,2774	0,02	0,06	0,18	0,12	0,11	0,08	0,22
Среднее ± ошибка среднего			0,19 ± 0,04	0,47 ± 0,10	0,44 ± 0,10	0,28 ± 0,06	0,42 ± 0,06	0,39 ± 0,10	0,32 ± 0,08
Образцы ЦТБ группы ФБ									
1	0,4045	2,767	0,35	0,41	0,35	0,43	0,22	0,25	0,38
2	0,2634	0,8825	0,50	0,6	0,57	0,53	0,62	0,56	0,39
3	0,8243	3,355	0,35	0,5	0,43	0,51	0,4	0,4	0,42
4	0,1327	3,571	0,38	0,45	0,59	0,52	0,41	0,5	0,4
5	0,0003	4,914 *	0,18	0,32	0,37	0,23	0,29	0,33	0,17
6	0,2286	6,286 *	0,21	0,37	0,26	0,27	0,23	0,13	0,19
Среднее ± ошибка среднего			0,33 ± 0,05	0,44 ± 0,04	0,43 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,36 ± 0,06	0,36 ± 0,07	0,33 ± 0,05
* — отмечено статистически значимое различие (P < 0,05); нумерация образцов приведена в соответствие с нумерацией в таблице 1									

и его отдельных фаз [15; 20; 40], что в свою очередь может снижать МИ. Однако, по-видимому, вследствие выраженных различий МИ в разных ворсинах, полученных из одного хориона, а также в образцах хориона от разных эмбрионов, нам не удалось выявить значимого влияния длительности инкубирования (коэффициент регрессии, недостоверно отличался от нуля, $P > 0,05$, табл. 2), а также наличия БДУ в питательной среде. Только для двух образцов № 5 и № 6, группы ФБ из 6 исследованных (табл. 2), были обнаружены статистически значимые различия ($t = 4,914$, $P < 0,05$; $t = 6,286$, $P < 0,05$).

Таким образом, в результате исследования нами отмечена тенденция к замедленному вступлению в митоз клеток ЦТБ в группе НБ, что свидетельствует о сниженном пролиферативном потенциале клеток ЦТБ при НБ. Однако способность к пролиферации клеток ЦТБ хориона при НБ повышается в условиях *in vitro* и не зависит от наличия БДУ в питательной среде. Полученные нами данные свидетельствуют, что использование полупрямого метода приготовления препаратов хромосом с инкубированием образцов хориона в течение 24–72 ч в сочетании с методом дифференциальной окраски РВА, предполагающем использование БДУ,

может повысить результативность и разрешающую способность цитогенетической диагностики при анализе причин неразвивающейся беременности. Кроме того, нами выявлены особенности организации прицентромерных ГХР хромосом 1, 9 и 16, которые выражались в необычной окраске флуорохромом АО и особенностях репликации. Следует подчеркнуть, что в настоящее время прицентромерному ГХР отводится важная роль в регуляции функций генома в развитии [35]. Однако вклад ГХР хромосом 1, 9 и 16, а также значение полиморфизма по этим районам продолжают оставаться загадочными.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам оперативного отделения ФГБУ НИИАГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН Л. К. Цуладзе и Е. И. Русиной за предоставление материала для исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11–04–01639-а) и Госконтракта № 02.740.11.0698.

Список литературы.

1. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. — СПб.: Изд-во Н-Л., 2007. — 439 с.

2. Барцева О.Б. Эффективность пренатальной цитогенетической диагностики в I и II триместрах беременности: автореф. дис... канд. биол. наук. — М., 1989. — 21 с.
3. Брусиловский А.И. Функциональная морфология плацентарного барьера человека. — Киев: Здоровье, 1976. — 129 с.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Электронная книга. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
5. Гринберг К.Н. Цитологические проявления хромосомного дисбаланса у человека // Прогресс в медицинской генетике (гетерогенность наследственной патологии человека) / под ред. Н.П. Бочкова. — М.: Медицина, 1978. — С. 151–186.
6. Дондуа А.К., Ефремов В.И. Митотический индекс // Метод биологии развития. — М.: Наука, 1974. — С. 134–135.
7. Епифанова О.И. Лекции о клеточном цикле. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2003. — 160 с.
8. Зыбина Е.В. Цитология трофобласта. — Л.: Наука, 1986. — 192 с.
9. Кулиев А.М. Фенотипические аспекты хромосомных эмбриолеталей человека: автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1976. — 48 с.
10. Кухаренко В.И. Клеточные и биохимические аспекты эмбриопатий человека с аномальным набором хромосом: автореф. дис... д-ра мед. наук. — М., 1995. — 47 с.
11. Морфология ворсинчатого хориона при спонтанных абортах с хромосомными аномалиями / Волощук И.Н. [и др.] // Медицинская генетика. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 38–41.
12. Особенности репликации прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в клетках хориона и эмбриональных тканей человека / Воробьева А.В. [и др.] // Цитология. — 2002. — Т. 44, № 9. — С. 868.
13. Патогенетические эффекты нестабильности эмбрионального генома в развитии человека / Лебедев И.Н. [и др.] // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, № 3. — С. 520–529.
14. Сравнительный анализ пролиферативного статуса цитотрофобласта ворсинчатого хориона при физиологической и неразвивающейся беременности / Трофимова И.Л. [и др.] // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / ред. А.Б. Масленников. — 2009. — № 13. — С. 259–264.
15. Хромосомы человека: атлас / Захаров А.Ф. [и др.]. — М.: Медицина, 1982. — 264 с.
16. Цирильников Н.И. Гистофизиология плаценты человека. — Новосибирск: Наука, 1989. — 184 с.
17. Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi / Vaczyk D. [et al.] // Placenta. — 2006. — Vol. 27. — P. 367–374.
18. Bischof P., Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2005. — Vol. 37. — P. 1–16.
19. Camargo M., Cervenka J. Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model // Hum. Genet. — 1982. — Vol. 34. — P. 757–780.
20. Complementary replication R- and G-band patterns induced by cell blocking at the R-band/G-band transition, a possible regulatory checkpoint within the S phase of the cell cycle / Fetti R. [et al.] // Cytogenet Cell Genet. — 1996. — Vol. 75. — P. 172–179.
21. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance // E. C. A. Newsletter. — 2006. — № 17. — P. 15–32.
22. Detection of 5-Bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step/Moran R. [et al.] // Histoch. Cytoch. — 1985. — Vol. 33, № 8. — P. 821–827.
23. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies / Buck S. [et al.] // BioTechniques. — 2008. — Vol. 44, № 7. — P. 927–929.
24. Effect of incubation time and serum concentration on the number of vitoses in aspirated villi samples / Terzoli G.L. [et al.] // First trimester fetal diagnosis/eds. Fraccaro M., Simoni G., Brambati B. — N.Y.: Springer-Verlag, 1985. — P. 197–200.
25. Genbacev O. Regulation of human placental development by oxygen tension // Science. — 1997. — Vol. 277, № 5332. — P. 1669–1672.
26. Genbacev O., Miller R.K. Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models—a review // Placenta. — 2000. — Vol. 21, suppl. A. — P. 45–49.
27. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. II. Mechanisms of polyploidization / Zybina T.G. [et al.] // Tsitologiya. — 2004. — Vol. 46. — P. 640–648.
28. Genome-wide DNA replication profile for Drosophila melanogaster: a link between transcription and replication timing / Schubeler D. [et al.] // Nat. Genet. — 2002. — Vol. 32, № 3. — P. 438–442.
29. Jurisicova A., Detmar J., Caniggia I. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth // Birth Defects Res C Embryo Today. — 2005. — Vol. 75, № 4. — P. 262–280.
30. Kennerknecht I., Baur-Aubelle S., Vogel W. Proliferation kinetics in native chorionic villus cell // Prenat. Diagn. — 1992. — Vol. 11, № 8. — P. 591–595.
31. Kim S., Dubey D., Huberman J. Early-replicating heterochromatin // Genes. Dev. — 2003. — Vol. 17, № 3. — P. 330–335.
32. Koulischer L., Hustin J., Gillerot Y. Histologic study of tritiated thymidine incorporation by trophoblastic villi in the first trimester // First trimester fetal diagnosis / eds. Fraccaro M., Simoni G., Brambati B. — N.Y.: Springer-Verlag, 1985. — P. 161–163.
33. Late chorionic villus sampling: cytogenetic aspects / Dalpra L. [et al.] // Prenat. Diagn. — 1993. — Vol. 13, N 11. — P. 239–246.
34. Latt S., Schreck R. Sister Chromatid Exchange Analysis // Hum. Genet. — 1980. — Vol. 32. — P. 297–313.
35. Parris G.E. Developmental diseases and the hypothetical master development program // Medical Hypotheses. — 2010. — Vol. 74. — P. 564–573.

36. Rapid karyotyping for prenatal diagnosis in the second and third trimester of pregnancy / Basaran S. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 4. — P. 315–320.
37. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase / Weidtkamp-Peters S. [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* — 2006. — Vol. 125. — P. 91–102.
38. *Vanderlaan M., Thomas C.B.* Characterisation of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine // *Cytometry.* — 1985. — Vol. 6. — P. 501–505.
39. *Vogel W., Auteurieth M., Speit G.* Detection of bromodeoxyuridine-incorporation in mammalian chromosomes by a bromodeoxyuridine-antibody. I. Demonstration of replication patterns // *Hum. Genet.* — 1986. — Vol. 72. — P. 129–132.
40. *Zahed L., Murer-Orlando M., Bobrow M.* Cell cycle studies in chorionic villi // *Human Genetics.* — 1988. — Vol. 80. — P. 127–134.

Статья представлена В. С. Барановым,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

PECULIARITY OF MITOTIC ACTIVITY OF CHORIONIC VILLI CYTOTROPHOBLAST ON THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

Trofimova I. L., Evdokimenko E. V., Kuznetzova T. V.

■ **Summary:** Mitotic activity of chorionic villi cytotrophoblast of the 1st trimester at normal and missed pregnancy was studied. Proliferative activity of cytotrophoblast from missed abortions was somewhat increased in vitro. Application of a semidirect method of chromosomal preparation from chorionic villi is more efficient and provides better resolution for cytogenetic diagnostics of missed abortion. Unusual peculiarity in organization and replication of pericentric heterochromatin regions of chromosomes 1, 9 and 16 was detected.

■ **Key words:** cytotrophoblast; mitotic index; proliferative activity; heterochromatic regions.

■ Адреса авторов для переписки

Трофимова Ирина Леонидовна — научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных болезней. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

E-mail: irina311@inbox.ru.

Евдокименко Ева Валерьевна — студентка кафедры генетики и селекции биолого-почвенного факультета. Санкт-Петербургский государственный университет.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

Кузнецова Татьяна Владимировна — д. б. н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных болезней.

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

E-mail: tkuznetzova@mail.ru

Trofimova Irina Leonidovna — research collaborator in Laboratory for prenatal diagnosis of inherited and inborn disorders.

Ott's Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS.

199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3.

E-mail: irina311@inbox.ru.

Evdokimenko Eva Valer'evna — student of Department of Genetics and Breeding, Faculty of Biology and Soil Sciences. St. Petersburg State University.

199034, Russia, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9.

Kuznetzova Tatyana Vladimirovna — Dr. Sci, Prof., Leading Researcher. Laboratory for prenatal diagnosis of inherited and inborn disorders.

Ott's Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS.

199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3.

E-mail: tkuznetzova@mail.ru