



Биол. журн. Армении, 2 (63), 2011

## FISH-АНАЛИЗ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА ИНДУЦИРОВАННЫХ МИТОМИЦИНОМ С МИКРОЯДЕР

Г.Г. ОГАНЕСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии  
E-mail: hovgalina@list.ru

Проанализирован хромосомный состав индуцированных митомицином С микроядер (МЯ) флюоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) с применением центромерных проб и проб для целых 3, 4, 6, 16 и 17 хромосом в лейкоцитах человека. Не выявлено зависимости частоты присутствия хромосом в МЯ от их размера, плотности генов и локализации в ядре. Показано, что миграция изученных хромосом в МЯ определяется главным образом спецификой действия ММС на определенные участки хромосом человека. Комбинированное применение FISH с МЯ тестом позволяет идентифицировать мишени действия мутагенов на хромосомах.

*Микроядра - лейкоциты человека - флюоресцентная гибридизация  
in situ (FISH) - митомицин С*

Միտոմիցին С-ով ինդուկցված միկրոկորիզների (ՄԿ) քրոմոսոմային կազմը վերլուծվել է ֆլյուորեսցենտ *in situ* հիբրիդացման (FISH) միջոցով 3, 4, 6, 16 և 17 քրոմոսոմների ցենտրոմերային և ամբողջական քրոմոսոմային զոնդերի կիրառմամբ մարդու լեյկոցիտներում: Չի հայտնաբերվել նշված քրոմոսոմների ՄԿ-ում առկայության կախվածություն քրոմոսոմների չափերից, գեների խտությունից և դիրքից կորիզում: Ցույց է տրվել, որ քրոմոսոմների միգրացիան ՄԿ-ներ գլխավորապես կախված է մարդու քրոմոսոմների որոշակի հատվածների զգայությունից միտոմիցին С-ի նկատմամբ: FISH-ի և ՄԿ թեստի համակցված կիրառումը թույլ է տալիս նույնականացնել մուտագենների ազդեցության քրոմոսոմային թիրախները:

*Միկրոկորիզներ - մարդու լեյկոցիտներ - ֆլյուորեսցենտ in situ  
հիբրիդացում (FISH) - միտոմիցին С*

Chromosomal contents of mitomycin C (MMC)-induced micronuclei (MN) were analyzed using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with application of centromeric and whole chromosome painting probes for chromosomes 3, 4, 6, 16 and 17 in human leukocytes. No significant correlation has been observed between the frequencies of migration of chromosomes investigated in MN and their size, gene density and position in nuclei. The probability of chromosome migration in MN is defined basically by MMC action on specific regions of human chromosomes. MN-FISH can be applied for identify chromosomal targets of mutagenic substances.

*Micronuclei – human leukocytes – fluorescence in situ hybridization (FISH) –  
mitomycin - C*

Микроядерный (МЯ) тест широко используется для скрининга генотоксических соединений *in vitro* и *in vivo*. МЯ образуются из хромосомных фрагментов

или целых хромосом, не присоединившихся к митотическому веретену и отставших при расхождении хромосом во время клеточного деления. В настоящее время применяется МЯ тест с цитокинетическим блоком в присутствии цитохалазина В, позволяющий распознавать прошедшие один цикл деления двуядерные клетки [8]. При совместном применении МЯ теста с флюоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) можно охарактеризовать хромосомный состав МЯ. Применение различных FISH проб позволяет различать МЯ, образованные при потерях или разрывах хромосом, а также определять относительное участие определенных хромосом или их фрагментов в формировании МЯ [4, 9, 14].

Исследования с применением FISH показали повышенную частоту повреждений определенных хромосом при действии *in vitro* некоторых мутагенов. Соединения ванадия преимущественно индуцируют образование МЯ с акроцентрическими D и G хромосомами [13]. В МЯ, индуцированных диэтилстилбестролом, преобладают хромосомы 14, 19 и 21, а в митомицин С (ММС) - индуцированных МЯ – хромосомы 1 и 9 [5]. Хромосомы 1, 9, 15, 16 и Y обнаружены в МЯ при действии 5-азациитидина [3, 6]. Хромосомы 1 и 9 преобладают в идоксуридин индуцированных МЯ [7]. Анеуплоидия хромосомы 8 встречается чаще, чем анеуплоидия хромосомы 7 в МЯ после действия метаболитов бензола [1].

Целью настоящего исследования была оценка частоты миграции хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 и их фрагментов в ММС-индуцированные МЯ в лейкоцитах человека и анализ зависимости частоты миграции от размера хромосом, плотности генов и их локализации в интерфазном ядре.

**Материал и методика.** Периферическая кровь была взята у двух доноров. Цельная кровь с гепарином культивировалась в питательной среде RPMI 1640 (1:10), содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота, 1% пенициллина/стрептомицина и 10 мкг/мл фитогеммаглутинина.

МЯ тест с блокированием цитокинеза был реализован по методике [8]. Через 22 ч после начала культивирования был добавлен цитохалазин В (3 мкг/мл). Кровь культивировалась 72 ч при 37°C. По окончании культивирования клетки обрабатывались гипотоническим раствором KCl (0.075 M) при +4°C в течение 3 мин. Клетки фиксировались дважды в фиксаторе этанол:уксусная кислота (3:1). МЯ идентифицировались по критериям [8].

Техника FISH была реализована по стандартной схеме [11]. 1732 МЯ от первого донора гибридизировались с центромерными пробами для хромосом 6 (SpectrumOrange; Abbott/Vysis, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany) и 17 (Diethylaminocoumarin; Abbott/Vysis). 1416 МЯ от второго донора гибридизировались с центромерными пробами для хромосом 3 (SpectrumOrange; Abbott/Vysis), 4 (SpectrumAqua; Abbott/Vysis) и 16 (SE 16 (D16Z2), Poseidon Satellite Enumeration Probes KREATECH Diagnostics, Vlierweg 20 1032 LG Amsterdam, The Netherlands).

Координаты МЯ регистрировались для последующей гибридизации МЯ с пробами для целых хромосом. На втором этапе МЯ первого донора гибридизировались с пробами для целых хромосом 6 (SpectrumOrange) и 17 (Cy5), МЯ второго донора – с пробами для целых хромосом 3 (SpectrumOrange), 4 (Cy5) и 16 (SpectrumGreen). Пробы для целых хромосом готовились в соответствии с рекомендациями [10].

996 из 1732 МЯ от первого донора были проанализированы с применением проб для целых хромосом. Остальные МЯ были потеряны или повреждены при втором раунде гибридизации. 1416 МЯ от второго донора были проанализированы после гибридизации с центромерными пробами и пробами для целых хромосом. Клетки, потерянные во втором раунде гибридизации, были исключены из исследования. Анализ и регистрация изображений проводились с применением автоматической системы Isis (MetaSystems).

**Результаты и обсуждение.** Для оценки присутствия материала хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в ММС-индуцированных МЯ в лейкоцитах человека применялась флюоресцентная гибридизация с центромерными пробами и пробами для целых хромосом. Результаты FISH анализа хромосомного состава ММС-индуцированных

МЯ представлены в табл. 1. В табл. 2 представлены литературные данные о размере, плотности генов и локализации в ядре для изученных хромосом. Табл. 3 демонстрирует степень корреляции между частотой присутствия хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в МЯ и их размером, плотностью генов и локализацией в ядре. Наблюдаемые и ожидаемые частоты миграции хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в МЯ представлены в табл. 4, где ожидаемые частоты рассчитаны на основе допущения о том, что вероятность повреждений хромосом прямо пропорциональна их размеру.

**Таблица 1.** Частота МЯ с центромерными сигналами и сигналами для целых хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в лейкоцитах человека после воздействия ММС.

|         | Хромосомы | Количество МЯ в экспериментах с |                            |                            |                                 |
|---------|-----------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
|         |           | центромерными пробами           | центромерными сигналами, % | пробами для целых хромосом | сигналами для целых хромосом, % |
| Донор 1 | 6         | 1732                            | 16 (0.92)                  | 994                        | 22 (2.21)                       |
|         | 17        | 1732                            | 8 (0.46)                   | 994                        | 16 (1.61)                       |
| Донор 2 | 3         | 1416                            | 6 (0.42)                   | 1416                       | 21 (1.48)                       |
|         | 4         | 1416                            | 5 (0.35)                   | 1416                       | 18 (1.27)                       |
|         | 16        | 1416                            | 3 (0.21)                   | 1416                       | 43 (3.04)                       |

**Таблица 2.** Размер, плотность генов и локализация в ядре хромосом 3, 4, 6, 16 и 17.

| Хромосомы | Локализация хромосом в ядре* | Размер хромосом (млн пар оснований)** | Плотность генов (на млн нуклеотидов)** |
|-----------|------------------------------|---------------------------------------|--|
| 17        | Центральная                  | 81                                    | 13.68                                  |
| 6         | Центральная                  | 171                                   | 5.86                                   |
| 16        | Центральная                  | 90                                    | 8.67                                   |
| 3         | Периферическая               | 198М                                  | 5.20                                   |
| 4         | Периферическая               | 191М                                  | 3.77                                   |

\* Последовательность хромосом соответствует их позиции в ядре от центра к периферии.

\*\* Данные из Stewart Scherer "Guide to Human Genome", 2010

Применение проб для целых хромосом позволило оценить частоту встречаемости хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в МЯ. Одновременное применение центромерных проб на тех же препаратах позволило различить присутствие целых хромосом и хромосомных фрагментов в МЯ. Число сигналов для целых хромосом превышает число центромерных сигналов для всех изученных хромосом. Таким образом, кластоген ММС преимущественно индуцирует образование МЯ с хромосомными фрагментами. Однако слабовыраженный анеугенный эффект также характерен для ММС и отмечен в лимфоцитах человека в публикациях [16, 19].

Хромосомы с относительно высоким (хромосомы 3 и 6) и низким (хромосомы 4, 16 и 17) содержанием ДНК обнаруживаются в МЯ реже ожидаемого в соответствии с их размерами уровня. Только для хромосомы 16 ожидаемая частота миграции в МЯ совпадает с наблюдаемой.

**Таблица 3.** Корреляция между уровнем миграции хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в МЯ и размером, плотностью генов и локализацией хромосом в ядре (результаты регрессионного анализа)

| Сравниваемые параметры  | Коэффициент корреляции |
|---|------------------------|
| МЯ с центромерными сигналами / размер хромосом                    | 0.31                   |
| МЯ с центромерными сигналами / плотность генов на хромосомах      | -0.13                  |
| МЯ с центромерными сигналами / локализация хромосом в ядре        | -0.35                  |
| МЯ с сигналами для целых хромосом / размер хромосом               | -0.54                  |
| МЯ с сигналами для целых хромосом / плотность генов на хромосомах | 0.21                   |
| МЯ с сигналами для целых хромосом / локализация хромосом в ядре   | 0.45                   |

**Таблица 4.** Наблюдаемые и ожидаемые частоты миграции хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в МЯ.

| Хромосома (размер, млн пар оснований) | Ожидаемая (на основе размера хромосом) частота МЯ с сигналами, %* | Наблюдаемая частота МЯ с центромерными сигналами, % | Наблюдаемая частота МЯ с сигналами для целых хромосом, % |
|---------------------------------------|---|---|--|
| 17 (81)                               | 2.7   | 0.46  | 1.61   |
| 6 (171)                               | 5.7   | 0.92  | 2.21   |
| 16 (90)                               | 3   | 0.21  | 3.04   |
| 3 (198)                               | 6.6   | 0.42  | 1.48   |
| 4 (191)                               | 6.37  | 0.35  | 1.27   |

\*Ожидаемые частоты рассчитаны на основе предположения, что частота встречаемости хромосом в МЯ прямо пропорциональна их размеру.

Хромосомы 16 и 17 с более высокой плотностью генов и хромосомы 3, 4 и 6 с более низкой плотностью присутствуют в МЯ с различной частотой. Предполагаемого понижения уровня повреждений хромосом с повышением плотности генов [15] не наблюдается.

Хромосомы с более центральной локализацией в ядре (6, 16 и 17) чаще встречаются в МЯ, чем хромосомы с более периферической локализацией (3 и 4).

Таким образом, корреляция частот встречаемости хромосом 3, 4, 6, 16 и 17 в МЯ с их размером, плотностью генов и локализацией в ядре не обнаружена. Однако FISH анализ ММС-индуцированных МЯ позволил выявить сравнительно высокую (3.04%) частоту встречаемости материала хромосомы 16 в МЯ. Ранее было показано, что ММС вызывает разрывы преимущественно в перичентромерных гетерохроматических блоках хромосом 1, 9 и 16 [2, 17, 18].

Полученные результаты свидетельствуют о неслучайном распределении индуцированных ММС цитогенетических повреждений в лейкоцитах человека. Согласно данным, полученным для хромосом 3, 4, 6, 16 и 17, вероятность миграции хромосом в МЯ определяется главным образом спецификой действия ММС на определенные участки хромосом человека. Таким образом, можно предположить, что данные цитогенетического анализа индуцированных мутагенами повреждений,

полученные МЯ тестом, адекватно отражают результаты, получаемые методом анализа хромосомных aberrаций. Полученные данные являются предварительными. Необходим анализ всех хромосом для более полного понимания факторов, определяющих вероятность их миграции в МЯ. Комбинированное применение FISH с МЯ тестом позволяет идентифицировать мишени действия мутагенов на хромосомах и может применяться для оценки действия различных мутагенных факторов.

*Работа выполнена при поддержке гранта DAAD.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chung H.W., Kang S.J., Kim S.Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutat. Res.*, 516, 49–56, 2002.
2. Cohen M.M., Shaw M.W. Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.*, 23, 386-395, 1964.
3. Guttenbach M., Schmid M. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp. Cell Res.*, 211, 127–232, 1994.
4. Hovhannisyanyan G., Mkrtchyan H., Liehr T., Aroutiounian R. Involvement of chromosomes 7, 18 and X in mitomycin C-induced micronuclei. *BJMG*, 11(2), 45-49, 2008.
5. Fauth E., Scherthan H., Zankl H. Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C- and diethylstilboestrol-induced micronuclei. *Mutagenesis*, 15, 459-467, 2000.
6. Fauth E., Scherthan H., Zankl H. Frequency of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine treated lymphocytes revealed by chromosome painting. *Mutagenesis*, 13, 235–241, 1998.
7. Fauth E., Zankl H. Comparison of spontaneous and idoxuridine-induced micronuclei by chromosome painting. *Mutat. Res.*, 440, 147–156, 1999.
8. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455, 81–95, 2000.
9. Leach N.T., Jackson-Cook C. The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent in situ hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei. *Mutat. Res.*, 495, 11-19, 2001.
10. Liehr T., Claussen U. Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr. Mol. Med.*, 2(3), 283-297, 2002.
11. Liehr T., Thoma K., Kammler K., Gehring C., Ekici A., Bathke K.D., Grehl H., Rautenstrauss B. Direct preparation of uncultured EDTA-treated or heparinised blood for interphase FISH analysis. *Appl. Cytogenet.*, 21(6), 185-188, 1995.
12. Manvelyan M., Hunstig F., Bhatt S., Mrasek K., Pellestor F., Weise A., Simonyan I., Aroutiounian R., Liehr T. Chromosome distribution in human sperm – a 3D multicolour banding-study. *Molecular Cytogenetics*, 1:25, 2008.
13. Migliore L., Scarpato R., Falco P. The use of fluorescence in situ hybridization with a  $\beta$ -satellite DNA probe for the detection of acrocentric chromosomes in vanadium-induced micronuclei. *Cytogenet. Cell Genet.*, 69, 215–219, 1995.
14. Norppa H., Falck G.C. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18, 221-233, 2003.
15. Rapp A., Bock C., Dittmar H., Greulich, K.-O. UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J. Photochem. Photobiol. B*, 56, 109–117, 2000.

16. *Renzi L., Pacchierotti F., Russo A.* The centromere as a target for the induction of chromosome damage in resting and proliferating mammalian cells: assessment of mitomycin C-induced genetic damage at kinetochores and centromeres by a micronucleus test in mouse splenocytes. *Mutagenesis*, 11(2), 133-138, 1996.
17. *Rupa D.S., Schuler M., Eastmond D.A.* Detection of hyperdiploidy and breakage affecting the 1cen-1q12 region of cultured interphase human lymphocytes treated with various genotoxic agents. *Environ. Mol. Mutagen.*, 29, 161–167, 1997.
18. *Sontakke Y.A., Fulzele R.R.* Cytogenetic study on genotoxicity of antitumor-antibiotic Mitomycin C. *Biomedical Research*, 20 (1), 40-44, 2009.
19. *Thomson E.J., Perry P.E.* The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis*, 3, 415-418, 1988.

*Поступила 14.02.2011*