

И.Ю. ЮРОВ¹, Л. ВИЛЛАРД², С.Г. ВОРСАНОВА³,
И.А. ДЕМИДОВА³, Е.А. ГОЙКО³, С.А. ШАЛЬНОВА⁴,
М.А. ШКОЛЬНИКОВА³, А.М. ОЛФЕРЬЕВ⁴,
Ю.Б. ЮРОВ¹

¹ Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

² INSERM U491, Медицинский факультет Университета, Марсель, Франция

³ Институт педиатрии и детской хирургии МЗ РФ, Москва

⁴ Центр профилактической медицины МЗ РФ, Москва

ОСОБЕННОСТИ ИНАКТИВАЦИИ ХРОМОСОМЫ X У ПОЖИЛЫХ ЖЕНЩИН СТАРШЕ 70 лет



Исследованы особенности инактивации хромосомы X у 40 женщин в возрасте от 74 до 85 лет. В качестве контрольной группы исследовали 36 женщин (средний возраст 30 лет). Использовали общепринятый метод метилчувствительной рестрикции и последующей количественной полимеразной цепной реакции (ЦАП) экспансии повторов гена андрогенного рецептора (HUMARA). Нами не обнаружено зависимости особенностей X инактивации от возраста. В частности, в группе пожилых женщин лишь три из 40 (7,5 %) имели неравную X-инактивацию по сравнению с двумя из 36 (5,5 %) в контрольной группе. Сравнение полученных данных с литературными показывает, что различие в оценке X-инактивации разных возрастных групп может быть связано с рядом методических погрешностей, а именно, высокой возрастной гетерогенностью исследуемых групп; включением в исследование женщин с различными генетическими нарушениями, приводящими к сдвигу инактивации, а также различиями границ дифференциации равной и неравной инактивации хромосомы X.

© И.Ю. ЮРОВ, Л. ВИЛЛАРД, С.Г. ВОРСАНОВА,
И.А. ДЕМИДОВА, Е.А. ГОЙКО, С.А. ШАЛЬНОВА,
М.А. ШКОЛЬНИКОВА, А.М. ОЛФЕРЬЕВ,
Ю.Б. ЮРОВ, 2004

Введение. Инактивация хромосомы X представляет собой эпигенетический феномен, за счет которого осуществляется регуляция дозы генов хромосом X у млекопитающих женского пола, в результате чего в клетках женщин транскрипционно активна лишь одна из родительских хромосом [1]. Направленность процесса инактивации хромосом X является случайной, следовательно, женский организм содержит две популяции клеток: в одной активна отцовская, в другой — материнская хромосома X. Таким образом, в клетках женских особей наблюдается мозаичная экспрессия материнских и отцовских генов хромосомы X со средним вкладом каждой хромосомы X в 50 %. Поскольку процесс инактивации в клетках случайный, то теоретически вклад каждой хромосомы может существенно варьировать, приводя к неравной инактивации хромосомы X [2]. Известно, что ряд генетических факторов приводит к неравной инактивации (сдвиг инактивации). В настоящее время имеются многочисленные данные о том, что неравная инактивация хромосомы X характерна для различных нарушений, связанных с хромосомой X. Основными генетическими причинами неравной X-инактивации являются структурные аномалии хромосомы X (например, делеции, сбалансированные и несбалансированные транслокации и др.) [3]. Известны также данные о том, что неравная инактивация хромосомы X является характерной для различных раковых образований [4]. Так, неравная X-инактивация встречается с повышенной частотой у женщин, страдающих раком груди [5]. Кроме того, негативные мутации генов хромосомы X (летальные или снижающие жизнеспособность клетки) также могут приводить к неравной X-инактивации. Например, среди женщин, асимптоматических носителей мутаций хромосомы X, более 50 % имеют сдвиг X-инактивации. Это связано с тем, что клетки с активной хромосомой X без генетических нарушений имеют селективное преимущество в жизнеспособности по сравнению с клетками, в которых хромосома X с мутацией является активной [3, 6].

Анализ особенностей инактивации хромосомы X у нормальных женщин (без фенотипического проявления какой-либо наследственной патологии) показал, что неравная X-инактивация наблюдается в пределах от 3 до 17 %

[6, 7]. В ходе изучения этого феномена ряд исследователей [8–10] обнаружили значительное увеличение (более чем в два раза) числа индивидуумов с неравной X-инактивацией среди женщин пожилого возраста. Эти факты позволили высказать предположение о том, что неравная X-инактивация связана со старением. Имеются также данные об отсутствии достоверной зависимости особенностей X-инактивации от возраста [7]. Таким образом, однозначного ответа на вопрос о зависимости феномена неравной инактивации хромосомы X от возраста в литературе не имеется.

В настоящей работе мы провели анализ особенностей X-инактивации у женщин пожилого возраста (от 74 до 85 лет). Данная группа представляется одной из наиболее старых и гомогенных по возрасту в сравнении с ранее исследованными. В качестве контроля были исследованы 36 женщин в возрасте от 9 лет до 51 года без фенотипических проявлений врожденных и наследственных нарушений, а также не имеющих близких родственников с болезнями, связанными с аномалиями хромосомы X.

Материалы и методы. Особенности инактивации хромосомы X были исследованы у 40 женщин в возрасте от 74 до 85 лет (средний возраст 78 лет) и у 36 женщин от 9 лет до 51 года (средний возраст 30 лет) контрольной группы. Все исследованные женщины не имели в анамнезе хромосомных и генных болезней.

Геномную ДНК выделяли из клеток лимфоцитов периферической крови стандартным методом с модификациями, разработанными в лаборатории молекулярной цитогенетики Московского НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ и лаборатории цитогенетики Научного центра психического здоровья РАМН [11].

Изучение особенности инактивации хромосомы X проводилось по ранее описанному методу [12] с некоторыми модификациями [6, 13]. Рестрикция геномной ДНК метилчувствительным ферментом HpaII проводилась с помощью стандартного протокола. Праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляли собой (ЦАГ)_n фланкирующие последовательности интрона 1 гена андрогенного рецептора (HUMARA): AR-P1 (5'-меченый IRD-800) 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGC GTGC-3' и AR-P2 5'-GCTGTGAAGGTTGCT

GTTCC TCAT-3'. ПЦР проводилась с 150 нг ДНК, обработанной и не обработанной ферментом HpaII. Реагенты, использованные для проведения ПЦР, были следующими: бифер 0,2 ммоль/л; dNTPs, 1,25 ммоль/л; Mg²⁺ 0,75 ммоль/л и 0,5 ед. Taq-полимеразы. Температура отжига составила 55 °C для 30 циклов. Продукты ПЦР анализировали с помощью LiCor-Lincoln NE секвенатора и компьютерных программ ONE-D Scan и Scion Image Beta 4.0.2. Соотношение метилированных аллелей (степень сдвига в проц.) определялось по формуле

$$\frac{S_1}{S_1 + S_2} \cdot 100 \%,$$

где S₁ — площадь под кривой интенсивности продуктов амплификации одного аллеля гена HUMARA, S₂ — площадь под кривой интенсивности продуктов амплификации другого аллеля этого гена. Для учета возможной погрешности в результате неполной рестрикции ДНК, а также для верификации гетерозиготности родительских аллелей проводилась количественная оценка образцов, не обработанных HpaII.

Статистическую обработку проводили по общепринятому критерию Стьюдента с использованием компьютерной программы STATISTICA V.5.733.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ особенностей инактивации хромосомы X проводился с помощью метилчувствительной рестрикции и последующей количественной ПЦР (ЦАГ)_n экспансии повторов гена андрогенного рецептора (HUMARA). На рис. 1 приведены два примера анализа особенностей инактивации хромосомы X: А — неравная инактивация хромосомы X (степень сдвига 90 %), Б — равная инактивация хромосомы X (степень сдвига 58 %).

Результаты исследования представлены на рис. 2. Анализ полученных данных показывает, что среди женщин старше 70 лет (средний возраст 78 лет) лишь трое из 40 (7,5 %) имели значительный сдвиг X-инактивации (более 80 %). В контрольной группе, состоявшей из 36 женщин от 9 лет до 51 года (средний возраст 30 лет), неравная X-инактивация была обнаружена у двух (5,5 %). Статистический

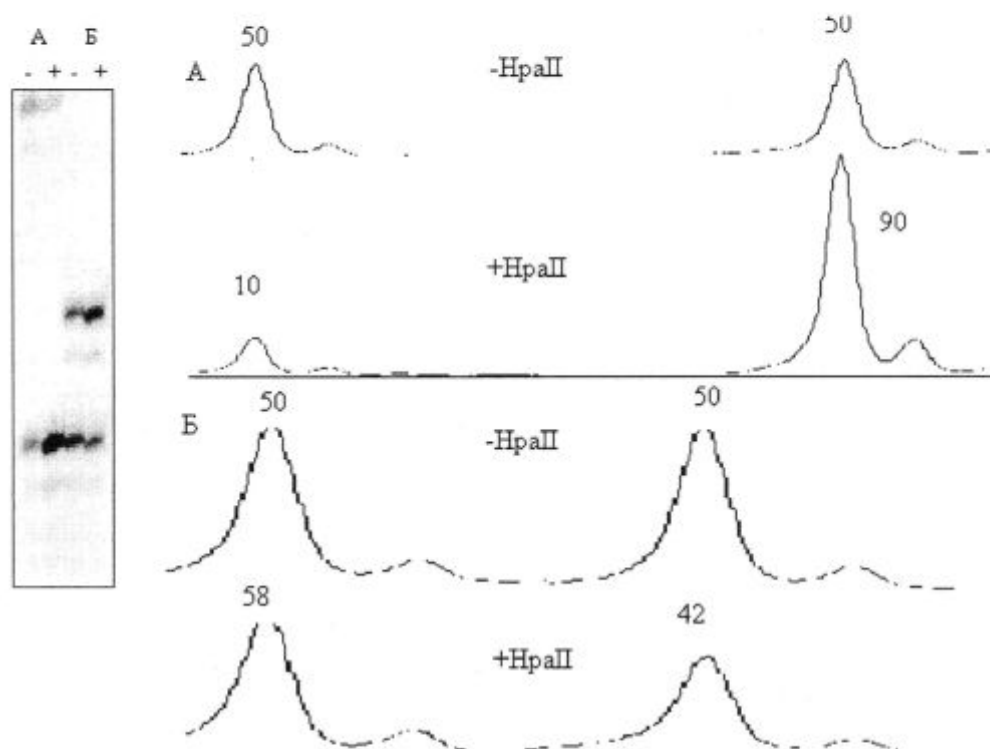


Рис. 1. Анализ особенностей инактивации хромосомы X: А — неравная инактивация хромосомы X (степень сдвига 90 %); Б — равная инактивация хромосомы X (степень сдвига 58 %) (–HpaII — ДНК не обработана ферментом HpaII; +HpaII — ДНК обработана ферментом HpaII)

анализ показал, что отличие особенностей инактивации хромосомы X в этих двух группах недостоверно ($p > 0,4$).

По-видимому, при сравнении особенностей инактивации хромосомы X в разных группах женщин необходимо корректное определение границы дифференциации неравной и равной инактивации хромосомы X. Поскольку средняя ошибка методов определения статуса метилирования хромосомы X составляет около 10 % [12], некоторые авторы считают соотношение активности хромосомы X как 1:3 (степень сдвига $>75\%$) границей дифференциации [14]. Другие определяют границу дифференциации неравной и равной инактивации хромосомы X как соотношение 1:10 (степень сдвига $>90\%$) [9–12]. Граница дифференциации, определенная как 75 %, представляется неудобной, так как, учитывая 10%-ную погрешность методов исследования, полученные данные об особенностях X-инактивации, лежащие в диапазоне от 60 до 80 %, могут быть трактованы неправильно. В свою очередь 90%-ная граница мо-

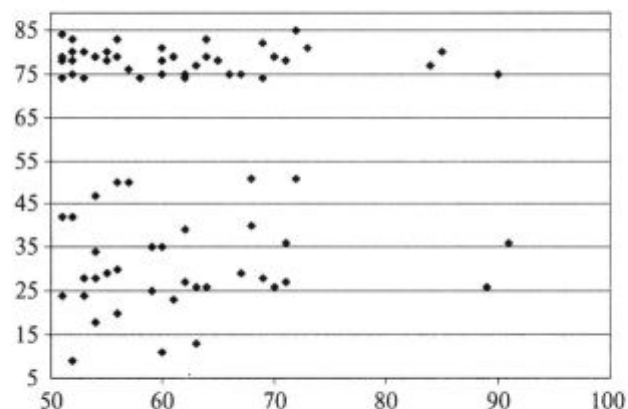


Рис. 2. Степень сдвига инактивации хромосомы X (по горизонтали, %) у женщин разного возраста (по вертикали)

жет быть применена лишь при исследовании стопроцентной инактивации одной из хромосом X, что при изучении случайно выбранной группы женщин может привести к некорректной оценке ее частоты. В связи с этим в последних работах о неравной X-инактивации принято считать наиболее оптимальной сте-

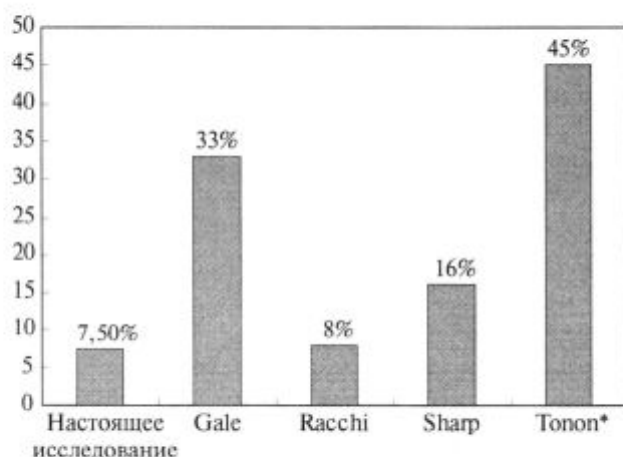


Рис. 3. Анализ неравной X-инактивации (по вертикали, %) у женщин старше 74 лет по данным разных авторов. * Неравной X-инактивацией считалась степень сдвига >75 %

пенью сдвига величину в более чем 80 % [6]. Поэтому в качестве границы дифференциации неравной и равной инактивации хромосомы X нами было выбрано соотношение активности хромосом X как 1:4.

Многочисленные исследования особенностей инактивации у нормальных женщин показали, что частота индивидуумов с неравной X-

инактивацией может варьировать в пределах от 3 до 17 % [6, 7, 15]. В настоящей работе частота индивидуумов с неравной инактивацией хромосомы X составила 5,5 % в контрольной группе и 7,5 % у женщин пожилого возраста. Следовательно, частота неравной X-инактивации в этих группах женщин находится в пределах величин, определенных ранее для нормальных женщин.

Изучая особенности X-инактивации в разных возрастных группах, исследователи из других стран показали увеличение числа индивидуумов с неравной инактивацией хромосомы X среди женщин старше 60 лет более чем в два раза (таблица). В дальнейших исследованиях несмотря на то, что была обнаружена повышенная частота неравной инактивации хромосомы X среди пожилых женщин, было показано, что данные о зависимости неравной X-инактивации от возраста статистически недостоверны. Несоответствие полученных данных ранее опубликованным было объяснено различием в статистической обработке [7]. Примечательно, что в данной работе частота женщин с неравной инактивацией хромосомы X составила 8 %, что практически идентично величине, определенной в настоящем исследовании (7,5 %).

На рис. 3 изображены данные разных исследователей о неравной X-инактивации у женщин старше 74 лет. Следует отметить исключительную вариабельность частоты неравной X-инактивации в этой возрастной группе. При изучении инактивации хромосомы X в группах старше и моложе 60 лет в разных работах (таблица) было обнаружено, что X-инактивация имеет тенденцию изменяться с возрастом. Для объяснения данного феномена была выдвинута гипотеза, согласно которой X-инактивация изменяется с возрастом преимущественно в клетках крови, поскольку клетки — предшественники крови являются наиболее митотически активными в организме. Обновление этой линии клеток происходит регулярно, таким образом, предполагается, что в связи со случайным характером феномена X-инактивации разные соотношения активности родительских хромосом X могут наблюдаться в клетках крови на протяжении жизни организма [10].

Сравнительный анализ полученных данных с литературными (таблица, рис. 3) показывает,

Особенности инактивации хромосомы X в зависимости от возраста по данным разных авторов, %

Авторы	Возраст, годы		p
	<60	>60	
Настоящее исследование	5,5	7,5	Отличие недостоверно (p > 0,4)
Brusque et al., 1996 [7]	16	38	0,006
Gale et al., 1997 [6]	3	33	<0,0001
Naumova et al., 1996 [12]	9	—	—
Plenge et al., 2002 [4]	3	—	—
Racchi et al., 1998 [5]	4	8	Отличие недостоверно
Sharp et al., 2000 [8]	7	16	<0,05
Tonon et al., 1998 [13]	17	45	<0,02

что значительные отличия результатов разных авторов могут объясняться рядом методических причин, в частности, корректным отбором групп исследования. Так, была исследована генетически гетерогенная группа пожилых женщин [10], в состав которой входили родственники больных с наследственными болезнями: синдромы Ангельмана и Прадера-Вилли, муковисцидоз, болезнь Хантингтона и наследственная форма рака груди, которая, как было впоследствии показано, характеризуется повышенным процентом женщин с неравной X-инактивацией [5]. Следовательно, данную группу нельзя рассматривать как нормальную для изучения особенностей X-инактивации. В другой работе обнаружен наибольший процент индивидуумов с неравной X-инактивацией среди женщин старше 70 лет (45 %) [14]. Это связано с тем, что граница дифференциации неравной и равной инактивации хромосомы X была установлена в >75 % (соотношение 1:3). На указанном примере можно видеть, как трактовка данных зависит от выбора границы дифференциации неравной и равной X-инактивации. При обнаружении повышенной частоты неравной X-инактивации среди нормальных женщин можно рекомендовать проводить сравнительный анализ особенностей X-инактивации в клетках разных тканей организма, тем более что в некоторых работах было показано отличие результатов по X-инактивации в клетках разных тканей [16]. В связи с этим реальное соотношение активности хромосом X в клетках организма оценить сложно и следует учитывать все методические погрешности.

В настоящей работе проведены исследования особенностей X-инактивации одной из самых старых и гомогенных по возрасту групп женщин (74–85 лет). Полученные данные с учетом вышеобозначенных проблем, возникающих при подобных исследованиях (определение границы дифференциации неравной и равной X-инактивации, использование наиболее корректного метода для определения особенностей X-инактивации [12], а также способов статистической обработки [6,7,10]), свидетельствуют о том, что инактивация хромосомы X не имеет тенденцию изменяться с возрастом. Согласно нашим результатам, особенность X-инактивации не связана со старе-

нием, а данные предыдущих работ, свидетельствующие об обратном, скорее всего, объясняются различием методических подходов к анализу и генетической гетерогенностью исследованных групп.

SUMMARY. In the present study we have analyzed X chromosome inactivation patterns in 40 women aged from 74 to 85 years (mean age 78 years). The control group was 36 women (mean age 30 years). The most common AR-assay was used to determine X-inactivation patterns (the study of methylation patterns of HpaII site in human androgen receptor gene (HUMARA) by quantitative PCR). The age dependence of X-inactivation was not observed. We have detected skewed X-inactivation in three women among 40 (7.5%) elderly women comparing to two women among 36 (5.5%) women from control group. The difference was not found to be statistically significant. We made a suggestion that higher incidence of skewed X-inactivation in elderly women revealed by previous studies could occur due to some experimental ambiguities as heterogeneity of the group studied; inclusion of women having relatives with genetic abnormalities associated with skewed X-inactivation patterns; the difference of X chromosome inactivation skewing determination. We conclude that present study does not show X chromosome inactivation to be age dependent.

РЕЗЮМЕ. Досліджували особливості інактивації хромосоми X у 40 жінок у віці від 74 до 85 років, контрольна група становила 36 жінок (середній вік 30 років). Використовували загальноприйнятий метод метилчутливої рестрикції та наступної кількісної полімеразної реакції (ЦАГ), експансії повторів гена андрогенного рецептора (HUMARA). Не виявили залежності особливостей X-інактивації від віку. Зокрема, у групі жінок похилого віку тільки три з 40 (7,5 %) мали нерівну X-інактивацію в порівнянні з двома з 36 (5,5 %) у контрольній групі. Порівняння одержаних даних з літературними показало, що відмінність в оцінці X-інактивації різних вікових груп може бути пов'язана з рядом методичних погіршень, а саме: високою віковою гетерогенністю досліджуваних груп; включенням в дослідження жінок з різними генетичними порушеннями, що призводять до зрушення інактивації, а також відмінностями кордонів диференціації рівної та нерівної інактивації хромосоми X.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lyon M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*) // *Nature*. — 1961. — **190**. — P. 372–373.
2. Belmont J.W. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing // *Amer. J. Hum. Genet.* — 1996. — **58**. — P. 1101–1108.
3. Puck J.M., Willard H.F. X inactivation in females with X-linked diseases // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — **338**. — P. 325–327.

4. Brown C.J. Skewed X-chromosome inactivation: cause or consequence? // J. Nat. Cancer Inst. — 1999. — **91**. — P. 304–305.
5. Kristiansen M., Langerod A., Knudsen G.P., Weber B.L., Borresen-Dale A-L., Orstavik K.H. High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients // J. Med. Genet. — 2002. — **39**. — P. 30–33.
6. Plenge R.M., Stevenson R.A., Lubs H.A., Schwartz C.E., Willard H.F. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders // Amer. J. Hum. Genet. — 2002. — **71**. — P. 168–173.
7. Racchi O., Mangerini R., Rapezzi D., Rolfo M., Gaetani G.F., Ferraris A.M. X chromosome inactivation patterns in normal females // Blood Cells Mol. Dis. — 1998. — **24**. — P. 439–447.
8. Gale R.E., Fielding A.K., Harrison C.N., Linch D.C. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age // Brit. J. Haematol. — 1997. — **98**. — P. 512–519.
9. Brusque L., Mio R., Mattioli J., Blais N., Lalonde Y., Maragh M., Gilliland D.G. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios varies with age // Blood. — 1996. — **88**. — P. 59–65.
10. Sharp A., Robinson D., Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X-chromosome inactivation ratios in normal women // Hum. Genet. — 2000. — **107**. — P. 343–349.
11. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Демидова И.А. Бесфенольный метод выделения ДНК из клеток крови для молекулярной диагностики наследственных болезней. МНИИПДХ МЗ РФ. 1989. Рац. предложение № 747.
12. Allen R.C., Zoghbi H.Y., Moseley A.B., Rosenblatt H.M., Belmont J.W. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation // Amer. J. Hum. Genet. — 1992. — **51**. — P. 1229–1239.
13. Юров И.Ю., Виллард Л., Ворсанова С.Г., Улас В.Ю., Юров Ю.Б. Исследование особенностей инактивации хромосомы X у больных с синдромом Ретта // Сибир. вестн. психиатрии и наркологии. — 2003. — **1**. — С. 26–28.
14. Tonon L., Bergamaschi G., Dellavecchia C., Rosti V., Lucotti C., Malabarba L., Novella A., Vercesi E., Frasson F., Cazzola M. Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women // Brit. J. Haematol. — 1998. — **102**. — P. 996–1003.
15. Naumova A.K., Plenge R.M., Bird L.M., Leppert M., Morgan K., Willard H.F., Sapienza C. Heritability of X chromosome--inactivation phenotype in a large family // Amer. J. Hum. Genet. — 1996. — **58**. — P. 1111–1119.
16. Gale R.E., Wheadon H., Boulos P., Linch D.C. Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns // Blood. — 1994. — **83**, № 10. — P. 2899–2905.

Поступила 07.12.04