

Главный редактор  
ГИНТЕР Е.К.  
академик РАН, д.б.н., профессор  
Заместители главного редактора  
ПУЗЫРЕВ В.П.  
академик РАН, д.м.н., профессор  
БАРАНОВ В.С.  
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор  
Ответственный секретарь  
ИЖЕВСКАЯ В.Л.  
д.м.н.

Редакционная коллегия  
АРЧАКОВ А.И.  
академик РАН, д.б.н., профессор  
ВОЕВОДА М.И.  
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор  
ДУРНЕВ А.Д.  
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор  
ИВАНОВ В.П.  
д.б.н., профессор  
ИЛЛАРИОШКИН С.Н.  
д.м.н., профессор  
КОЗЛОВА С.И.  
д.м.н., профессор  
КОПНИН Б.П.  
д.б.н., профессор  
КУЦЕВ С.И.  
д.м.н.

КУЧИНСКАС В. (Kucinskas V.)  
академик Литовской АН, д.б.н., профессор  
ЛИМБОРСКАЯ С.А.  
д.б.н., профессор  
МАЦЕК М. (Macek M. Jr.)  
доктор медицины и педиатрии (MD),  
доктор философии по медицине  
и молекулярной генетике (PhD), профессор

МИХАЙЛОВА Л.К.  
д.м.н., профессор  
НАЗАРЕНКО Л.П.  
д.м.н., профессор  
НОВИКОВ П.В.  
д.м.н., профессор  
НОСИКОВ В.В.  
д.б.н., профессор  
РОГАЕВ Е.И.  
д.б.н., профессор  
РУБЦОВ Н.Б.  
д.б.н., профессор  
СВЕРДЛОВ Е.Д.  
академик РАН, д.б.н., профессор  
СЕРЕДЕНИН С.Б.  
академик РАН, д.м.н., профессор  
СМИРНОВ В.Н.  
академик РАН, д.м.н., профессор  
СТЕПАНОВ В.А.  
д.б.н., профессор  
ХУСНУТДИНОВА Э.К.  
д.б.н., профессор  
ЧЕХОНИН В.П.  
академик РАН, д.б.н., профессор  
ЧУЧАЛИН А.Г.  
академик РАН, д.м.н., профессор

Издатель: Иришкин Дмитрий  
E-mail: genius-media@mail.ru

Адреса редакции:  
115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1,  
Федеральное государственное  
бюджетное учреждение  
Медико-генетический научный центр РАМН  
Тел. (499) 612-81-07, факс: 324-07-02  
E-mail: L\_Tarlycheva@med-gen.ru

Внимание авторов и читателей:  
Рукописи и иллюстрации не возвращаются.  
При перепечатке материалов согласование с редакцией журнала «Медицинская генетика» обязательно. За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.

© Российское общество медицинских генетиков  
© Российская академия медицинских наук  
© ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»  
© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич  
Тираж 200 экз.

# Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2017 г. Том 16. №12 (186)

## СОДЕРЖАНИЕ

Обращение главного редактора .....3

### НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Назаренко М.С., Слепцов А.А., Марков А.В., Пузырев В.П.  
Вариабельность генома соматических клеток при многофакторных заболеваниях человека .....4

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гайнер Т.А., Карамышева Т.В., Каримова О.Г., Корень О.Л.,  
Шлома В.В., Шорина А.Р., Богомолов А.Г., Рубцов Н.Б.  
Комплексная диагностика хромосомной патологии —  
деривата хромосомы 4 и малой сверхчисленной маркерной хромосомы .....9

Кашеварова А.А., Беляева Е.О., Никонов А.М., Плотникова О.В.,  
Гергерт И.Г., Никитина Т.В., Скрябин Н.А., Мензоров А.Г., Гридина М.М.,  
Васильев С.А., Лопаткина М.Е., Савченко Р.Р., Чурилова А.В.,  
Толмачева Е.Н., Серов О.Л., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.  
Спонтанная хромосомная нестабильность в клетках с кольцевой хромосомой  
как основа хромосомной терапии .....18

Скрябин Н.А., Васильев С.А., Толмачева Е.Н., Шорина А.Р.,  
Савченко Р.Р., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.  
Паттерн метилирования ДНК в участках генома с наследуемыми CNV .....27

Харьков В.Н., Колесников Н.А., Раджабов М.О.,  
Хитринская И.Ю., Степанов В.А.  
Генофонд коренных народов Дагестана андийской группы по аутосомным STR-маркерам .....31

Харьков В.Н., Новикова Л.М., Штыгашева О.В., Агеева Е.С.,  
Волков В.Г., Хитринская И.Ю., Степанов В.А.  
Анализ родоплеменной структуры хакасов по маркерам Y-хромосомы .....35

Беляева Е.О., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Лопаткина М.Е.,  
Салюкова О.А., Филимонова М.Н., Лежнина О.В., Шорина А.Р.,  
Масленников А.Б., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.  
Частота и спектр хромосомных микродупликаций  
у пациентов с нарушениями умственного развития .....39

Маркова Ж.Г., Миньженкова М.В., Тарлычева А.А.,  
Цветкова Т.Г., Галкина В.А., Шилова Н.В.  
Фенотипическая вариабельность у пациентов с *de novo* X-аутосомными  
несбалансированными транслокациями .....43

### ПОЗДРАВЛЯЕМ!

К 90-летию Доры Клавдиевны Верлинской .....48

### ИНФОРМАЦИЯ

Содержание журнала «Медицинская генетика» в 2017 г. ....49

Алфавитный указатель авторов журнала «Медицинская генетика» в 2017 г. ....54

Editor-in-Chief  
GINTER E.K.  
Deputy Editors-in-chief  
PUZYREV V.P.  
BARANOV V.S.

Executive editor  
IZHEVSKAYA V.L.

Editorial Board  
ARCHAKOV A.I.  
VOEVODA M.I.  
DURNEV A.D.  
IVANOV V.P.  
ILLARIOSHKIN S.N.  
KOZLOVA S.I.  
KOPNIN B.P.  
KUTZEV S.I.  
KUCINSKAS V.  
LIMBORSKAYA S.A.  
MACEK M. Jr.  
MIKHAYLOVA L.K.  
NAZARENKO L.P.  
NOVIKOV P.V.  
NOSIKOV V.V.  
ROGAEV E.I.  
RUBTZOV N.B.  
SVERDLOV E.D.  
SEREDENIN S.B.  
SMIRNOV V.N.  
STEPANOV V.A.  
KHUSNUTDINOVA E.K.  
CHEKHONIN V.P.  
CHUCHALIN A.G.

Publisher: Irishkin Dmitry  
E-mail: genius-media@mail.ru

# Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2017. Volume 16. №12 (186)

## Content

Editorial .....3

### REVIEWS

*Nazarenko M.S., Sleptcov A.A., Markov A.V., Puzyrev V.P.*  
Genome variability of somatic cells in human complex diseases.....4

### ARTICLES

*Gayner T.A., Karamysheva T.V., Karimova O.G., Koren O.L., Shloma V.V., Shorina A.R., Bogomolov A.G., Rubtsov N.B.*  
Comprehensive chromosomal pathology diagnostic of derivative of the 4 chromosome and the small supernumerary marker chromosome .....9

*Kashevarova A.A., Belyaeva E.O., Nikonov A.M., Plotnikova O.V., Gergert I.G., Nikitina T.V., Skryabin N.A., Menzorov A.G., Gridina M.M., Vasilyev S.A., Lopatkina M.E., Savchenko R.R., Churilova A.V., Tolmacheva E.N., Serov O.L., Nazarenko L.P., Lebedev I.N.*  
Spontaneous chromosomal instability in cells with a ring chromosome as the basis for chromosomal therapy .....18

*Skryabin N.A., Vasiliev S.A., Tolmacheva E.N., Shorina A.R., Savchenko R.R., Kashevarova A.A., Lebedev I.N.*  
DNA methylation pattern in regions of the genome with inherited CNV .....27

*Kharkov V.N., Kolesnikov N.A., Radzhabov M.O., Khitrinskaya I.Y., Stepanov V.A.*  
Gene pool of the Andi populations of Dagestan from the data of STR markers .....31

*Kharkov V.N., Novikova L.M., Shtygasheva O.V., Ageeva E.S., Volkov V.G., Khitrinskaya I.Y., Stepanov V.A.*  
Analysis of the tribal structure of Khakass from Y-chromosome markers .....35

*Belyaeva E.O., Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Lopatkina M.E., Salyukova O.A., Filimonova M.N., Lezhnina O.V., Shorina A.R., Maslennikov A.B., Nazarenko L.P., Lebedev I.N.*  
Prevalence and spectrum of chromosomal microduplications in patients with mental retardation.....39

*Markova Zh.G., Minzhenkova M.V., Tarlicheva A.A., Tsvetkova T.G., Galkina V.A., Shilova N.V.*  
Phenotypic variability in patients with *de novo* unbalanced X-autosomal translocations.....43

### CONGRATULATION

Verlinskaya Dora K. ....48

### INFORMATION

The content of Journal «Medical Genetics» in 2017.....49  
Authors index in 2017.....54

# Обращение главного редактора

## Уважаемый читатель!

2017 год — юбилейный для одного из ведущих российских научно-исследовательских институтов в области медицинской генетики — НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Открытый в 1982 году в статусе Отдела Института медицинской генетики АМН СССР в г. Москве, и преобразованный в 1987 году в самостоятельное учреждение, Институт стал центром компетенций в сфере популяционно-генетических, цитогенетических и молекулярно-генетических исследований. Работы томских коллег широко известны не только в России, но и за рубежом. В списке наиболее значимых научных достижений коллектива первые генетико-эпидемиологические исследования в популяциях коренных народов Сибири, первые отечественные работы по проблеме неканонического наследования у человека, передовой опыт в апробации и внедрении молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических технологий для диагностики хромосомных и наследственных заболеваний, включая пренатальную и преимплантационную. Высокий уровень проводимых в НИИ медицинской генетики фундаментальных и прикладных исследований подтверждается многочисленными публикациями в ведущих научных журналах, монографиями, докладами на престижных научных форумах. НИИ медицинской генетики традиционно оказывается в списке лидеров по числу выигранных на конкурсной основе грантов отечественных и международных научных фондов.

Поворотным моментом в истории Института стало открытие в 1994 году на его базе первой и до сих пор единственной в России Генетической клиники. Значимость такого события трудно переоценить. Это уникальная в своем роде клиника, концентрируя поток пациентов с наследственными заболеваниями, стала площадкой для проведения фундаментальных научных исследований в области клинической и медицинской генети-

ки, внедрения в практику здравоохранения современных видов специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи, для подготовки кадров высшей квалификации. Неудивительно, что именно в Томске при участии специалистов НИИ медицинской генетики в 1999 году на базе Томского медицинского института (в настоящее время Сибирского государственного медицинского университета) была открыта первая в Сибири кафедра медицинской генетики. На протяжении многих лет в Институте успешно функционирует диссертационный совет, принимающий к защите диссертационные работы на соискание ученой степени кандидата и доктора наук по специальности «Генетика», по отраслям знаний — биология и медицина.

Юбилейный для Института год коллектив отмечает проведением традиционной научной конференции «Генетика человека и патология». В Программе мероприятия — доклады ведущих специалистов Института и приглашенных российских и зарубежных коллег, выступления молодых ученых, дискуссии и круглые столы по актуальным проблемам медицинской генетики. На страницах настоящего и трех последующих номеров журнала «Медицинская генетика» опубликованы статьи, подготовленные по материалам устных докладов, представленных на XI научной конференции «Генетика человека и патология», состоявшейся 27–30 ноября 2017 года в Томске.

Редколлегия журнала «Медицинская генетика», президиум правления Российского общества медицинских генетиков поздравляют коллектив НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ с юбилеем, гордятся его результатами и желают достижения новых творческих вершин!

*Главный редактор академик РАН Е.К. Гинтер*

*Председатель Российского общества медицинских генетиков д.м.н. В.Л. Ижевская*

## Вариабельность генома соматических клеток при многофакторных заболеваниях человека

Назаренко М.С.<sup>1,2,3</sup>, Слепцов А.А.<sup>1</sup>, Марков А.В.<sup>1</sup>, Пузырев В.П.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

В обзоре обсуждается одно из перспективных фундаментальных направлений исследований генетики многофакторных заболеваний (МФЗ), связанное с изучением variability генома соматических клеток в органах-мишенях. Приведены результаты собственного исследования относительно variability числа копий участков ДНК и уровня метилирования ДНК в лейкоцитах периферической крови и клетках артерий при их атеросклеротическом поражении у человека. С практической точки зрения, выявленные молекулярные мишени могут быть использованы в качестве биомаркеров для профилактики, диагностики и лечения МФЗ.

**Ключевые слова:** многофакторные заболевания, вариации по числу копий участков ДНК, метилирование ДНК.

Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда (проекты № 14-15-00305 и № 16-15-10150).

### Genome variability of somatic cells in human complex diseases

Nazarenko M.S.<sup>1,2,3</sup>, Sleptcov A.A.<sup>1</sup>, Markov A.V.<sup>1</sup>, Puzyrev V.P.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>3</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation  
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

One promising fundamental area of research of genetics of complex diseases, related to the study of the genome variability of somatic cells in target organs was underlined in the review. The results of own research on the copy number variations and DNA methylation level in peripheral blood leukocytes and arterial cells in human atherosclerosis were shown. From a practical point of view, the identified molecular targets can be used as biomarkers for the prevention, diagnosis, and treatment of complex diseases.

**Key words:** complex diseases, copy number variation, DNA methylation.

### Введение

Развитие современных технологий позволило получить «непредвзятый» портрет молекулярно-генетических событий в различных тканях не только в сравнительном межиндивидуальном аспекте, но и на уровне отдельного организма, ткани и клеток. Действительно, применение высокоразрешающих методов исследований, таких, как микрочиповая технология и массовое параллельное секвенирование, обнаружило существенную меж- и внутриклеточную генетическую гетерогенность [1, 2]. Несмотря на то, что variability генома соматических клеток является физиологичным отражением их дифференцировки и процесса развития, интенсивно накапливаются данные, о её существенном вкладе в патогенез как онкопатологии, так и некоторых многофакторных заболеваний (МФЗ) [3].

### Вариабельность генома соматических клеток при МФЗ

В целом, исследования показывают, что variability генома соматических клеток детектируется на разных уровнях его организации. Так, точковые мутации в генах *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и *JAK2*, выявленные в клетках крови в виде клонального гематопоэза, ассоциированы с повышенным риском развития не только лейкозов, но и атеросклеротического поражения артерий и диабетической васкулопатии [4–6]. Вместе с тем, помимо точковых замен, в соматических клетках наблюдаются вариации числа копий участков ДНК (CNV, copy number variation) и анеуплоидии [3]. Показано, что накопленный груз и спектр CNV в клетках крови при достижении определенного «порога» вносит вклад в аутизм в виде «олигогенной гетерозиготности». Причем, большее количество редких и протяженных CNV,

включая варианты с неизвестной патогенетической значимостью, связаны с более тяжелой клинической картиной заболевания [7]. В то же время, потеря Y хромосомы в клетках крови является потенциальным предиктором риска развития как онкопатологии и повышенной смертности мужчин в пожилом возрасте, так и редких аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний [3].

Как правило, соматические мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) детектируются в опухолевых клетках злокачественных новообразований. Однако исследования показали, что в клетках миокарда и атеросклеротической бляшки у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), а также в клетках головного мозга у больных с болезнями Альцгеймера или Паркинсона также присутствует низкий уровень делеций мтДНК [8–10]. Остается неясным, являются ли данные мутации мтДНК в соматических клетках причиной или следствием патологического процесса. Вместе с тем, Ross и соавт. продемонстрировали на модельных мышах, что комбинация унаследованных точковых мутаций мтДНК, связанных с ранним старением, с *de novo* мутациями приводит к нарушению развития головного мозга [11]. Таким образом, учитывая, что изначально человек имеет низкий уровень гетероплазмичных мутаций, аналогичный механизм может лежать в основе патогенеза некоторых МФЗ, в том числе болезней Паркинсона и Альцгеймера [12]. Несомненно, сочетание унаследованных и *de novo* мутаций в соматических клетках имеет критическое значение для клинической манифестации МФЗ. Данное явление аналогично «двухударной» модели Кнудсена, описывающей подобные события при злокачественных новообразованиях [13].

Механизм, который объясняет участие соматических мутаций в формировании сложно наследуемого фенотипа, выходящего за рамки классических механизмов наследования, и получил название «парадоминантное наследование» [14]. Сущность данного механизма заключается в манифестации заболевания при сочетании мутаций, унаследованных и возникших *de novo* в соматических клетках [15]. Мутации передаются из поколения в поколение в гетерозиготном состоянии, поскольку их носители не имеют фенотипических проявлений, а гомозиготное состояние является летальным на ранних стадиях эмбрионального развития. Патологический признак проявляется только в том в случае, если потеря гетерозиготности произойдет в некоторой части соматических клеток на более поздних этапах онтогенеза.

Концепция «парадоминантного наследования» изначально была предложена для объяснения этиологии ряда наследственных синдромов, проявляющихся патологией кожных покровов — синдрома МакКьюна—Олбрайта, пигментных невусов Беккера [15]. Доказательства данного типа наследования также приведены для нарушений васкулогенеза, ангиогенеза и лимфангиогенеза. В частности, в клетках вен при их аномалиях на коже и слизистых у одного и того же человека идентифицированы как

унаследованные мутации, так и мутации *de novo* в гене эндотелиальной тирозиновой киназы (*TEK*). Таким образом, можно предположить, что этот феномен свойственен многим патологическим процессам у человека, в том числе имеющим многофакторную природу [16].

#### **Вариабельность генома клеток артерий и лейкоцитов периферической крови при атеросклерозе**

Патогенез атеросклеротического поражения артерий представляет собой многофакторный процесс, существенный вклад в его развитие вносит генетическая компонента [17]. Несмотря на активные исследования в области генетики атеросклероза и его осложнений, локусов, изменчивость которых может быть фактором риска развития и прогрессии данных заболеваний, известно относительно немного [18]. Одной из возможных причин является смещенная оценка в сторону наследуемых полиморфных генетических вариантов, тогда как вне поля зрения остаются «ожидаемые» изменения структуры и механизмов регуляции активности генов в соматических клетках в ходе онтогенеза или, по крайней мере, на этапах, предшествующих развитию заболевания [16].

Нашим исследовательским коллективом был проведен сравнительный анализ CNV и уровня метилирования ДНК клеток сосудов и лейкоцитов крови при выраженном атеросклеротическом поражении артерий у человека. В результате установлено, что у одного больного атеросклерозом в лейкоцитах увеличение числа копий участков ДНК в хромосомном регионе 10q24.31 (*ERLIN1*) унаследовано, а у двух других пациентов увеличение копийности данного участка ДНК произошло в результате постзиготических событий [19]. Это может быть отражением увеличения возраста и старения человека. Действительно, структурные варианты генома в виде CNV в мозаичном состоянии идентифицированы в лейкоцитах периферической крови и различных тканях здоровых индивидов [3].

В тоже время, в образцах ДНК лейкоцитов крови у трех индивидов контрольной группы, напротив, установлено уменьшение числа копий в хромосомном регионе 10q24.31 (*ERLIN1*) [20]. Возможно, что CNV в анализируемом регионе генома может быть новым генетическим маркером подверженности атеросклерозу. Следует отметить, что SNP в области гена *ERLIN1* связаны с неалкогольной жировой болезнью печени и ее биомаркером — уровнем аланин-аминотрансферазы в плазме крови [21]. Механизм ассоциации полиморфизма в данном гене с патологией неизвестен. Продукт гена *ERLIN1* (ER lipid raft associated 1) является холестерол-связывающим белком, который взаимодействует с комплексом SREBP-Scap-Insig, который ингибирует синтез холестерола при условии его достаточного содержания в клетке. Не исключено, что данная CNV может быть связана с риском атеросклеротического поражения артерий либо непосредственно, модулируя функциональную активность гена *ERLIN1* и вызывая на-

рушение гомеостаза липидов в клетках артерий, либо опосредованно, влияя на предрасположенность к его фактору риска — неалкогольной жировой болезни печени.

Между тем, вариабельность генома соматических клеток включает не только изменение структуры нуклеотидной последовательности ДНК, но и механизмы регуляции активности генов. Нами установлены умеренные различия уровня метилирования ДНК между клетками атеросклеротически измененных коронарных и сонных артерий и интактных сосудов (внутренних грудных артерий и больших подкожных вен). В исследованных тканях выявлено 14—31,8% дифференциально метилированных генов от всех проанализированных на микрочипе, а тех генов, CpG-сайты которых различались по уровню метилирования более чем на 20%, было 1,0—2,4%. Это существенно меньше, чем при злокачественных новообразованиях [22]. Тем не менее, данное наблюдение сопоставимо с ранее выявленными изменениями уровня метилирования ДНК в некоторых тканях и органах больных с заболеваниями, которые известны в качестве факторов риска атеросклеротического поражения артерий. Это подкожно-жировая клетчатка у женщин с ожирением, скелетные мышцы и подкожно-жировая клетчатка у близнецов, больных сахарным диабетом 2 типа, а также висцеральная жировая ткань у больных с метаболическим синдромом и при сочетании ожирения с инсулинорезистентностью [23—27]. Умеренные изменения уровня метилирования ДНК могут быть обусловлены тем, что он представляет собой интегральный показатель изменений различных клеток анализируемого образца. Возможно, что в работах, где используется цельный биоптат органа регистрируются кумулятивные изменения, которые происходят во многих клетках. Не исключено, что применение технологии работы с отдельными клетками прольет свет на изменение уровня метилирования ДНК с более высокой точностью.

Нами также установлено, что изменение уровня метилирования ДНК в клетках коронарных и сонных артерий, пораженных атеросклерозом, по сравнению с интактными сосудами направлено в сторону гиперметилирования. Весьма вероятно, что гиперметилирование ДНК в атеросклеротически измененных артериях на поздних стадиях патологического процесса является характерной чертой данного заболевания. Преобладание относительно гиперметилированных CpG-сайтов характерно для некоторых областей головного мозга при болезни Альцгеймера [28], а также миокарда левого желудочка больных дилатационной кардиомиопатией [29]. Такое распространенное гиперметилирование отдельных CpG-сайтов может являться отражением потери «пластичности» клеток или их зрелости, что вполне ожидаемо происходит у человека с возрастом. С другой стороны, это может быть причиной «ухудшения» функционирования атеросклеротически пораженных артерий на поздних стадиях патологического процесса.

Кроме того, выявлено, что гомеобокс-содержащие гены (*HOXD3*, *HOXD4*, *HOXA7* и *ALX4*) гипометилированы в клетках атеросклеротически измененных коронарных и сонных артерий по сравнению с интактными сосудами, что может быть признаком их ремоделирования на поздних стадиях патологического процесса. Снижение уровня метилирования ДНК целого ряда генов, включая *HOXD3*, *HOXD4* и *ALX4*, регистрируется в скелетных мышцах пациентов с ювенильным дерматомиозитом по сравнению с контрольной группой [30]. Такое сходство профиля метилирования гомеобокс-содержащих генов при атеросклерозе и таком хроническом системном аутоиммунно-воспалительном заболевании скелетных мышц с васкулопатией, как ювенильный дерматомиозит, косвенно свидетельствует об общности патогенеза данных патологических состояний. Более того, изменение уровня метилирования гомеобокс-содержащих генов в столовых клетках, а также в мышечных клетках отражает способность ткани к самовосстановлению и дифференцировке, что в настоящее время является фокусом интереса регенеративной медицины [31]. Вероятно, что изучение механизмов функциональной активности гомеобокс-содержащих генов в клетках сосудов, а также возможность их регуляции ляжет в основу обратимости атеросклеротического поражения артерий.

Важным результатом нашего исследования стало выявление гипометилирования в области гена *MIR10B* в клетках атеросклеротически измененных артерий по сравнению с интактными сосудами [32]. Параллельно с нашим исследовательским коллективом работали финские исследователи [33]. Они обнаружили гипометилирование более 140 областей генов микроРНК, включая *MIR10B*, с использованием технологии полногеномного бисульфитного секвенирования в атеросклеротических бляшках бедренных артерий по сравнению с интактными внутренними грудными артериями [33]. Это говорит о том, что данное событие неслучайно и может являться важной детерминантой атеросклеротического поражения артерий вне зависимости от его локализации. Предполагается, что *MiR-10b* потенциально может послужить перспективной терапевтической мишенью и кандидатом для разрабатываемых схем таргетной фармакотерапии, направленных на ее ингибирование и увеличение обратного транспорта холестерина из клеток при дислипидемиях [34].

Нами установлено, что изменение уровня метилирования в локусе 2q31.1 (*HOXD4/HOXD3/MIR10B*) в лейкоцитах пациентов ассоциировано с курением и ишемическим инсультом. В лейкоцитах пациентов уровень метилирования одного из CpG-сайтов выше у курящих ( $18 \pm 5\%$ ), чем у некурящих ( $14 \pm 6\%$ ;  $p < 0,05$ ), а уровень метилирования другого CpG-сайта анализируемого региона ниже у тех, кто перенес ишемический инсульт ( $18 \pm 8\%$ ) по сравнению с индивидами без инсульта в анамнезе ( $20 \pm 7\%$ ;  $p < 0,05$ ). Хотя изменение уровня метилирования ДНК между группами составляло 3%, даже такие значения могут быть связаны с изменением экспрессии генов и нарушать функцию клеток и органов [35].

Нами выявлено, что в клетках пораженных атеросклерозом артерий белковые продукты генов с гипометилированными CpG-сайтами, как и при злокачественных новообразованиях, связаны с иммуновоспалительным ответом, что объединяет патогенез данных патологических состояний. Активация иммуновоспалительного ответа через гипометилирование ДНК может быть связана с миграцией лимфоцитов (моноцитов) в патологический очаг или обусловлена различиями в метилировании ДНК резидентных клеток сосудов. Неудивительно, что при аутоиммунных заболеваниях показана тесная связь белковых продуктов дифференциально метилированных генов с иммуновоспалительным ответом, что также объединяет данные патологии с атеросклерозом.

Еще одним доказательством важности иммуновоспалительного компонента при атеросклерозе является то, что показаны существенные различия в уровне метилирования (на 20% и более) отдельных CpG-сайтов, локализованных в области генов иммуновоспалительного ответа (*S100A10*, *TLR4*, *TRAF1*, *BATF*, *PLA2G3*, *ALOX12*, *C10orf82*, *C11orf52/HSPB2*, *HRH2*, *C1QTNF3* и *CCL28*) между пораженными атеросклерозом артериями и интактными сосудами. Согласно данным литературы, эти гены экспрессируются в клетках крови и сосудов модельных животных или человека. Гены иммуновоспалительного ответа также картированы в области CNV в лейкоцитах и клетках артерий у больных атеросклерозом. Это хромосомные субсегменты 1p22.2 (*GBP3*), 1p13.1 (*IGSF3*), 2q31.2 (*PRKRA*), 5q35.3 (*BTNL3*), 22q13.1 (*APOBEC3B*, *APOBEC3A*), 12q24.11 (*UNG*, *ACACB*), 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*), а также семейство генов *DEFB*.

Следует отметить, что меньшая доля картированных CNV в лейкоцитах и клетках сосудов, а также идентифицированных дифференциально метилированных генов в клетках артерий, пораженных атеросклерозом, и интактных сосудов связана с атеросклерозом и его факторами риска в результате исследований генетических ассоциаций. Среди всех идентифицированных CNV 10 содержат гены, связанные с факторами риска атеросклероза. Это артериальная гипертензия — 1q31.3 (*CFHR3*, *CFHR1*), 3p21.1 (*SFMBT1*), 22q11.23 (*GSTT1*); индекс массы тела — 9p21.1 (*LINGO2*); неалкогольная жировая болезнь печени — 10q24.31 (*ERLIN1*); сахарный диабет 2 типа — 1p21.1 (*AMY2B*); метаболический синдром — 7q33 (*EXOC4*, *LRGUK*); 12q24.11 (*UNG*, *ACACB*); 16q13.12-q13.11 (*PDXDC1*); аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка — 10q21.3 (*CTNNA3*). С фенотипом заболевания в виде кальцификации коронарных артерий и утолщения комплекса интима-медиа сонных артерий связаны CNV в хромосомных субсегментах 1p22.2 (*GBP3*) и 10q21.1 (*PCDH15*), а с ишемической болезнью сердца — 16q22.1 (*PDPR*) и 22q11.23 (*GSTT1*, *LOC391322*).

Для 8 генов (*ALOX12*, *ALX4*, *TLR4*, *TRAF1*, *FABP1*, *TMEM182*, *ABCB11* и *NPR2*), дифференциально метилированных между артериями пораженных атеросклерозом

и интактными сосудами, ранее была показана связь с атеросклерозом и его факторами риска у человека путём анализа генетических ассоциаций. А именно, с атеросклерозом и его осложнениями в виде острых сосудистых событий ассоциирован полиморфизм генов *TLR4* и *TRAF1*, а для гена *ALOX12* установлена связь его полиморфизма с атеросклерозом, сахарным диабетом 2 типа и артериальной гипертензией. Следует отметить, что полиморфизм других генов связан не с атеросклерозом, а с его факторами риска. Гены *FABP1* и *ABCB11* — с метаболическими нарушениями (ожирение, метаболический синдром, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени), *TMEM182* и *NPR2* — с сосудистыми нарушениями в виде артериальной гипертензии, а *ALX4* — с сосудисто-метаболическими нарушениями в виде сахарного диабета 2 типа.

### Заключение

Таким образом, все более очевидными становятся данные о том, что некоторые болезни, имеющие генетическую компоненту, не обязательно являются унаследованными и могут быть ассоциированы с постзиготической вариабельностью генома соматических клеток. Структурные варианты генома соматических клеток, которые приводят к внутри- и межтканевой генетической гетерогенности, а также тканеспецифичные эпигенетические модификации генома играют важную роль в реализации сложно наследуемого фенотипа.

Регионарная подверженность и пенетрантность МФЗ может быть объяснена с позиций накопленного груза и спектра мутаций в соматических клетках их органов-мишеней. Возможно, что одни унаследованные и частые варианты, которые обычно выявляются с использованием анализа ассоциаций, играют важную роль на ранних стадиях формирования предрасположенности МФЗ, а другие варианты (в том числе структурные и эпигенетические), «канализируют» заболевание, определяя его специфичность и клиническую манифестацию в органе-мишени.

Согласно результатам проведенных исследований, у больных с выраженным атеросклеротическим поражением артерий меньшая доля картированных CNV в лейкоцитах и клетках сосудов, а также идентифицированных дифференциально метилированных генов между клетками артерий, пораженных атеросклерозом, и интактными сосудами связана с атеросклерозом и его факторами риска в результате исследований генетических ассоциаций. Это подчеркивает большой потенциал вариабельности генома соматических клеток в понимании молекулярных механизмов МФЗ. В результате работ, проведенных в данном направлении, могут быть идентифицированы новые патофизиологические пути и специфические мишени для профилактики, диагностики и лечения патологии.

Список литературы

1. O’Huallachain M, Karczewski KJ, Weissman SM, Urban AE, Snyder MP. Extensive genetic variation in somatic human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(44):18018-18023. doi:10.1073/pnas.1213736109.
2. Gottlieb B, Beitel LK, Trifiro M. Changing genetic paradigms: creating next-generation genetic databases as tools to understand the emerging complexities of genotype/phenotype relationships. *Hum Genomics.* 2014;8:9. doi:10.1186/1479-7364-8-9.
3. Forsberg LA, Gisselsson D, Dumanski JP. Mosaicism in health and disease — clones picking up speed. *Nat Rev Genet.* 2016;18(2):128-142. doi:10.1038/nrg.2016.145.
4. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
5. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017. doi:10.1056/NEJMoa1701719.
6. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017;355(6327):842-847. doi:10.1126/science.aag1381.
7. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367(14):1321-1331. doi:10.1056/NEJMoa1200395.
8. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res DNAGing.* 1992;275(3-6):169-180. doi:10.1016/0921-8734(92)90021-G.
9. Phillips NR, Simpkins JW, Roby RK. Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer’s brains: A review. *Alzheimer’s Dement.* 2014;10(3):393-400. doi:10.1016/j.jalz.2013.04.508.
10. Botto N, Berti S, Manfredi S, et al. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res — Fundam Mol Mech Mutagen.* 2005;570(1):81-88. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.10.003.
11. Ross JM, Stewart JB, Hagstrom E, et al. Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature.* 2013;501(7467):412-415. doi:10.1038/nature12474.
12. Keogh M, Chinnery PF. Hereditary mtDNA heteroplasmy: A baseline for aging? *Cell Metab.* 2013;18(4):463-464. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.015.
13. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-823. doi:10.1073/pnas.68.4.820.
14. Happle R. The McCune-Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin Genet.* 1986;29(4):321-324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3720010>. Accessed October 13, 2016.
15. Happle R. What is paradigm inheritance? *J Med Genet.* 2009;46(9):648. doi:10.1136/jmg.2009.069336.
16. Пузырев ВП, Назаренко МС, Лебедев ИН, и др. Феномен парадоминантного наследования при атеросклерозе. *Медицинская генетика.* 2014;10:41-48.
17. Дзининский АА, Пузырев ВП. Наследственность и атеросклероз. Наука. Новосибирск; 1977.
18. Khera A V., Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet.* 2017;18:331-344. doi:10.1038/nrg.2016.160.
19. Nazarenko MS, Sleptcov AA, Lebedev IN, et al. Genomic structural variations for cardiovascular and metabolic comorbidity. *Sci Rep.* 2017;7:41268. doi:10.1038/srep41268.
20. Слепцов АА, Назаренко МС, Барбараш ОЛ, Пузырев ВП. Вариации числа копий гена *ERLIN1* у больных с ишемической болезнью сердца. *Медицинская генетика.* 2016;15(5):42-44.
21. Feitosa MF, Wojczynski MK, North KE, et al. The *ERLIN1-CHUK-CWF19L1* gene cluster influences liver fat deposition and hepatic inflammation in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis.* 2013;228(1):175-180. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.038.
22. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 2012;22(2):407-419. doi:10.1101/gr.119867.110.
23. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, et al. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Differences in Muscle and Fat from Monozygotic Twins Discordant for Type 2 Diabetes. *PLoS One.* 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0051302.
24. Lokk K, Modhukur V, Rajashekar B, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol.* 2014;15(4):r54. doi:10.1186/gb-2014-15-4-r54.
25. Guenard F, Tchernof A, Deshaies Y, et al. Differential methylation in visceral adipose tissue of obese men discordant for metabolic disturbances. *Physiol Genomics.* 2014;46(6):216-222. doi:10.1152/physiolgenomics.00160.2013.
26. Amer P, Sinha I, Thorell A, Ryden M, Dahlman-Wright K, Dahlman I. The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. *Clin Epigenetics.* 2015;7(1):93. doi:10.1186/s13148-015-0126-9.
27. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep.* 2017;7:41903. doi:10.1038/srep41903.
28. Watson CT, Roussos P, Garg P, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer’s disease. *Genome Med.* 2016;8(1):5. doi:10.1186/s13073-015-0258-8.
29. Jo BS, Koh IU, Bae JB, et al. Methylome analysis reveals alterations in DNA methylation in the regulatory regions of left ventricle development genes in human dilated cardiomyopathy. *Genomics.* 2016;108(2):84-92. doi:10.1016/j.ygeno.2016.07.001.
30. Wang M., Xie H., Shrestha S., et al. Methylation alterations of WT1 and homeobox genes in inflamed muscle biopsy samples from patients with untreated juvenile dermatomyositis suggest self-renewal capacity. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(10):3478-3485. doi: 10.1002/art.34573.
31. Seifert A, Werheid DF, Knapp SM, Tobiasch E. Role of Hox genes in stem cell differentiation. *World J Stem Cells.* 2015;7(3):583-595. doi:10.4252/wjsc.v7.i3.583.
32. Nazarenko MS, Markov A V., Lebedev IN, et al. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122601. doi:10.1371/journal.pone.0122601.
33. Aavik E, Lumivuori H, Leppanen O, et al. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster. *Eur Heart J.* 2015;36(16):993-1000. doi:10.1093/eurheartj/ehu437.
34. Davalos A, Fernandez-Hernando C. From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Pharmacol Res.* 2013;75:60-72. doi:10.1016/j.phrs.2013.02.005.
35. Leenen FAD, Muller CP, Turner JD. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin Epigenetics.* 2016;8(1):92. doi:10.1186/s13148-016-0256-8.



## Комплексная диагностика хромосомной патологии — деривата хромосомы 4 и малой сверхчисленной маркерной хромосомы

Гайнер Т.А.<sup>1,2\*</sup>, Карамышева Т.В.<sup>3</sup>, Каримова О.Г.<sup>1,2</sup>, Корень О.Л.<sup>4</sup>, Шлома В.В.<sup>5,7</sup>, Шорина А.Р.<sup>6</sup>, Богомоллов А.Г.<sup>3</sup>, Рубцов Н.Б.<sup>3,7</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

<sup>2</sup> ООО «Центр персонализированной медицины», Новосибирск

<sup>3</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск

<sup>4</sup> ООО Центр семейной медицины «Здравица», Новосибирск

<sup>5</sup> ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

<sup>6</sup> ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», Новосибирск

<sup>7</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск

\* t.gainer@mail.ru

Цитогенетическая диагностика, проведенная только GTG-окрашиванием хромосом, не обеспечивает достаточной надежности и точности при идентификации структурно перестроенных хромосом. Для описания кариотипа в таких случаях требуется привлечение методов молекулярно-цитогенетического анализа. Целью данного исследования явилась отработка методов проверки, уточнения и коррекции результатов первичной цитогенетической диагностики комплексным использованием современных методов хромосомного анализа на примере двух пациентов с аномальными кариотипами. Выделение, культивирование лимфоцитов периферической крови, приготовление препаратов метафазных хромосом, GTG-, CBG-, Ag-NOR-дифференциальное окрашивание хромосом, супрессионную гибридизацию *in situ* проводили по стандартным протоколам. Получение и проверку качества микродиссекционных ДНК-проб выполняли, как описано ранее. Хромосомы после гибридизации *in situ* окрашивали красителем DAPI и идентифицировали, анализируя инвертированный DAPI-бэндинг. Используя GTG-, CBG-, Ag-NOR-дифференциальное окрашивание хромосом, супрессионную гибридизацию *in situ* специально подготовленных микродиссекционных ДНК-проб, кариотип пациента, ранее описанный как 46,XX,der(4)t(4;?)(p12;?) or del(4)(p12p15.2), был определен как 46,XX,del(4)(p12p15.2), а кариотип пациента, ранее описанный как 47,XY,+22, был определен как 47,XY,+inv dup(15)(q13). Использование дополнительных методов цитогенетического анализа, включающего методы дифференциального окрашивания хромосом и флуоресцентную гибридизацию *in situ* специально подготовленных ДНК-проб, дает возможность уточнить и, при необходимости, исправить описание кариотипа, что, в свою очередь, позволило точно и надежно описать кариотипы пациентов. Уточнение цитогенетического диагноза имеет большое значение для медико-генетического прогноза.

**Ключевые слова:** хромосомы, кариотип, цитогенетическое исследование, микродиссекция метафазных хромосом, флуоресцентная гибридизация *in situ*, медико-генетический прогноз.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа частично поддержана проектом ИЦИГ СО РАН №0324-2016-0024 и грантом РФФИ № 16-34-00498 мол\_а.

Авторы статьи выражают благодарность к.б.н. В.Г. Матвеевой за помощь в работе над статьей.

## Comprehensive chromosomal pathology diagnostic of derivative of the 4 chromosome and the small supernumerary marker chromosome

Gayner T.A.<sup>1,2\*</sup>, Karamysheva T.V.<sup>3</sup>, Karimova O.G.<sup>1,2</sup>, Koren O.L.<sup>4</sup>, Shloma V.V.<sup>5,7</sup>, Shorina A.R.<sup>6</sup>, Bogomolov A.G.<sup>3</sup>, Rubtsov N.B.<sup>3,7</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>2</sup> Center for Personalized Medicine, Ltd, Novosibirsk

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>4</sup> Centers of family medicine «Zdravitsa», Ltd, Novosibirsk

<sup>5</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>6</sup> State Novosibirsk regional budgetary institution « City clinical hospital №1», Novosibirsk

<sup>7</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk

\* t.gainer@mail.ru

Cytogenetic diagnosis performed only by GTG-staining does not provide sufficient reliability and accuracy in the identification of structurally rearranged chromosomes. To describe the karyotype in such cases, it is required to involve methods of molecu-

lar-cytogenetic analysis. The purpose of this study was to develop methods for testing, specification and correcting the results of primary cytogenetic diagnostics using complex methods of modern chromosomal analysis by two cases of patients with abnormal karyotypes. Separation and cultivation human peripheral blood lymphocytes, metaphase chromosome preparation, GTG-, CBG-, Ag-NOR-differential staining of chromosomes, chromosomal *in situ* suppression hybridization were done according to standard protocol. The creation of microdissection DNA probes and their quality control were performed as described previously. Chromosomes were counterstained with DAPI to visualize DNA after *in situ* hybridization. Inverted DAPI banding of chromosomes was used for chromosome identification, according to ISCN (2009). Using the GTG-, CBG-, Ag-NOR-staining of chromosomes, chromosomal *in situ* suppression hybridization with specially prepared microdissection DNA probes, the patient's karyotype, previously described as 46,XX,der(4)t(4;?)(p12;?) or del(4)(p12p15.2), was determined as 46,XX,del(4)(p12p15.2), and the patient's karyotype previously described as 47,XY,+22 was determined as 47,XY,+invdup(15)(q13). Applying methods of cytogenetic analysis, including methods of differential staining of chromosomes and fluorescent *in situ* hybridization with specially prepared DNA probes, allows to specify and, if necessary, to correct the description of the karyotype, resulting in accurate and reliable description of patient karyotypes. Clarification of the cytogenetic diagnosis is important for the medical-genetic predictions.

**Key words:** chromosomes, karyotype, cytogenetic tests, microdissection of metaphase chromosomes, fluorescence *in situ* hybridization, medico-genetic predictions.

### Введение

В настоящее время первичный кариотипический анализ пациентов, направленных на цитогенетическую диагностику, в большинстве российских и зарубежных лабораторий заключается в получении препаратов метафазных хромосом, их GTG (G-bands by trypsin using Giemsa)-окрашивании и анализе. Полученная при окрашивании специфическая поперечная исчерченность позволяет идентифицировать хромосомы и их районы. Однако при структурных хромосомных перестройках с участием небольших районов хромосом уровень разрешения, достижимый при использовании GTG-окрашивания, часто бывает недостаточным для постановки окончательного и надежного диагноза. Нередко не помогает даже исследование на прометафазных хромосомах. Особенную сложность для диагностики представляют небольшие несбалансированные транслокации, делеции, инсерции, а также маркерные хромосомы (MX). Уточнить кариотип пациента и дать ему обоснованный медико-генетический прогноз возможно привлечением дополнительных методов (CBG- и Ag-NOR-окрашивание, молекулярно-цитогенетические методы).

CBG (C-bands by barium hydroxide using Giemsa)-окрашивание (С-окрашивание) оказывается эффективным при анализе дополнительных и необычном увеличении стандартных С-позитивных районов хромосом, которые не приводят к нарушению баланса генов и могут быть рассмотрены как нормальный полиморфизм хромосом человека. В норме CBG-окрашивание выявляет небольшие блоки в прицентромерных районах всех хромосом, более крупные блоки гетерохроматина в прицентромерных районах длинных плеч хромосом 1, 9 и 16, блоки в коротких плечах акроцентрических хромосом и блок гетерохроматина в дистальной части длинного плеча Y хромосомы, заметно варьирующий у разных лиц мужского пола [1].

Ag-NOR (Nucleolar Organizer Region)-окрашивание (серебрение) выявляет активные ядрышкообразующие районы путём окрашивания азотнокислым серебром [2]. При этом в коротких плечах акроцентриков на спутничных нитях выделяются черные образования — глыбки

восстановленного металлического серебра. Размеры этих глыбок на разных хромосомах существенно варьируют — от отсутствия заметной окраски до достаточно крупных блоков. Этот метод позволяет с достаточно большой вероятностью определять малые сверхчисленные хромосомы, возникшие из акроцентрических хромосом, а также транслокации материала коротких плеч акроцентрических хромосом на другие хромосомы человека.

Эти варианты дифференциального окрашивания, к сожалению, не относятся к рутинным методам. Они не всегда воспроизводимы, требуют дополнительных затрат реактивов и рабочего времени. Однако в некоторых случаях применение этих методов позволяет решать проблемы, с которыми не могут справиться ни полногеномное секвенирование, ни сравнительная геномная гибридизация на микрочипах, так как кластеры повторенных последовательностей не выявляются при секвенировании и часто не детектируются сравнительной геномной гибридизацией на микрочипах. Следует заметить, что еще целый ряд хромосомных перестроек окрывается «невидимками» для этих современных мощных методов геномного и хромосомного анализа. Например, от их внимания полностью ускользают сбалансированные транслокации, выявление которых очень важно при медико-генетическом консультировании пар, планирующих деторождение.

В настоящей статье на двух конкретных примерах мы рассмотрели варианты комплексной цитогенетической диагностики с использованием различных методов дифференциального окрашивания хромосом и гибридизации *in situ* для уточнения и коррекции описания кариотипа пациента. В статье также обсуждается необходимость и значение анализа аномального генома непосредственно для пациентов и для дальнейшего прогресса в медицинской генетике.

*Целью данного исследования* явилась отработка методов проверки, уточнения и коррекции результатов первичной цитогенетической диагностики комплексным использованием современных методов хромосомного анализа на примере двух пациентов с аномальными кариотипами.

### Материалы и методы

Родители детей, включенных в настоящее исследование, подписали информированное согласие на использование соответствующих биоматериалов для научных исследований.

Культивирование лимфоцитов периферической крови, приготовление препаратов и дифференциальное окрашивание хромосом проводили по стандартным методикам [3]. Приготовление препаратов метафазных и прометафазных хромосом для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проводили стандартным методом [4]. Дифференциально окрашенные хромосомы анализировали на световом микроскопе OLYMPUS CX41 (Япония), для регистрации изображения использовали видеокамеру и программное обеспечение ВидеоТест-Карио 3.1 ООО Иста-Видео Тест (Россия).

Цитологические препараты метафазных хромосом для проведения микродиссекции готовили, как описано ранее [5, 6]. ДНК-пробы, гомологичные короткому и длинному плечам хромосомы 4 (*случай 1*), получали из 10 копий соответствующих районов хромосомы 4 здорового донора, собранных с цитологических препаратов, окрашенных красителем Гимза. ДНК-пробы (*случай 2*) также получали методом микродиссекции, путем амплификации ДНК двух ранее описанных маркерных хромосом *inv dup(15)(q11)* и *inv dup(15)(q13)*, собранных с цитологических препаратов, как описано ранее [5, 6]. Сбор интересующего хромосомного материала проводили на инвертированном микроскопе Axiovert 10 (объектив 100x, окуляр 10x, Zeiss), используя специально оттянутую стеклянную иглу, контролируемую микроманипулятором MR (Zeiss, Германия). Собранный материал обрабатывали протеиназой K (Roche, Швейцария) и амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с частично вырожденным праймером 6MW, как описано ранее [5,7]. Мечение ДНК, полученной в ДОП-ПЦР, проводили в дополнительных циклах ДОП-ПЦР в присутствии Alexa Fluor 488-5-dUTP (Molecular Probes, США), TAMRA-5-dUTP (Molecular Probes, США) [6]. FISH микродиссекционных ДНК-проб на метафазные хромосомы здорового донора и пациента проводили по стандартному протоколу CISS-гибридизации (*Chromosomal in situ Suppression hybridization*) с супрессией гибридизации повторенных последовательностей [8]. Общее окрашивание хромосом выполняли с использованием красителя DAPI (Sigma, Германия). Хромосомы и хромосомные районы идентифицировали, анализируя инвертированный DAPI-бэндинг. Для описания хромосом и хромосомных районов использовали стандартную номенклатуру хромосом человека [9].

Микроскопический анализ проводили на микроскопе AxioPlan 2 Imaging (Zeiss, Германия) с набором фильтров 49 (Zeiss, Германия), SP101 FITC (CHROMA, США) и SP103v1 Cy3tmv1 (CHROMA, США), CCD-камерой (CV M300, JAI Corporation, Япония). Для регистрации использовали программное обеспечение ISIS5

(METASystems GmbH). Микроскопию проводили в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

### Результаты и обсуждение

*Случай 1.* Восемилетняя девочка с умеренными когнитивными и неврозоподобными нарушениями. Вес при рождении нормальный (3280 г). Оценка по шкале Апгар 8/9 баллов. Отставала в раннем психомоторном развитии. Ползала на четвереньках с 12 месяцев. Начало самостоятельной ходьбы в 18 месяцев. Фразовая речь появилась на четвертом году жизни. Основной фенотипической особенностью на момент исследования являлась умственная отсталость легкой степени. Выявлены диспластическое телосложение, диффузная гипермобильность суставов, покатые плечи, узкая грудная клетка, гипотелоризм сосков, латерализация лопаток, грудной кифоз, поясничный гиперлордоз, крупные кисти и стопы, диспластичные, мягкие ногтевые пластины. Особенности строения лица: доминирование лобных отделов, длинная спинка носа, ямка на кончике носа, длинный фильтр, большой рот, маленький подбородок. На коже туловища несколько гипопигментных пятен, одно пятно цвета «кофе с молоком» на голени. В неврологическом статусе стволые симптомы — глазодвигательные нарушения, гиперсаливация и псевдобульбарная дизартрия. Диффузная умеренная мышечная гипотония и повышенные коленные рефлексы. Положительная проба Ромберга. Мелокинетическая диспраксия. Тикодные мимические гиперкинезы. Эпилептиформная активность на ЭЭГ. Со стороны эндокринной системы — гипотиреоз.

В результате стандартного цитогенетического исследования хромосом ребенка выявлено уменьшение размера короткого плеча хромосомы 4 (рис. 1). Причиной выявленной аномалии могла быть либо несбалансированная транслокация (возникшая *de novo* или унаследованная от родителей), либо возникшая *de novo* интерстициальная делеция. На основании анализа GTG-окрашенных хромосом кариотип пациентки был описан как 46,XX,der(4)t(4;?)(p12;?) or del(4)(p12p15.2).

Для уточнения диагноза было рекомендовано кариотипирование родителей. Они от обследования отказались. Было выполнено молекулярно-цитогенетическое исследование, включающее двухцветную супрессионную гибридизацию *in situ* микродиссекционных, плечеспецифичных ДНК-проб, специфичных короткому (PCP4p) и длинному (PCP4q) плечам хромосомы 4 (рис. 2) с хромосомами пациентки. Гибридизация PCP4p полностью окрасила р-плечи хромосом 4 и der(4), гибридизация PCP4q окрасила q-плечи этих хромосом. Сигнал на других хромосомах отсутствовал.

Район хромосомы der(4), окрашенный PCP4p, по размеру значительно уступал короткому плечу нормальной хромосомы 4. Результаты проведенного исследова-

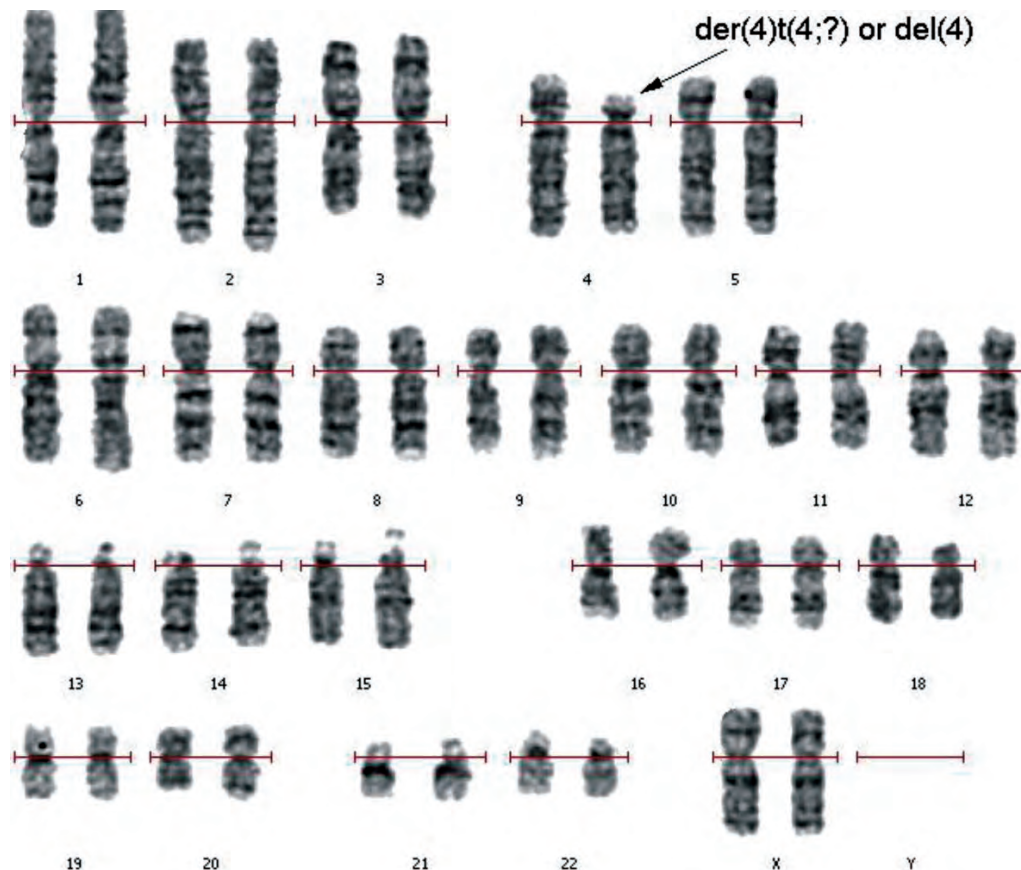


Рис. 1. Случай частичной моносомии короткого плеча хромосомы 4. Кариограмма, G-окрашивание.

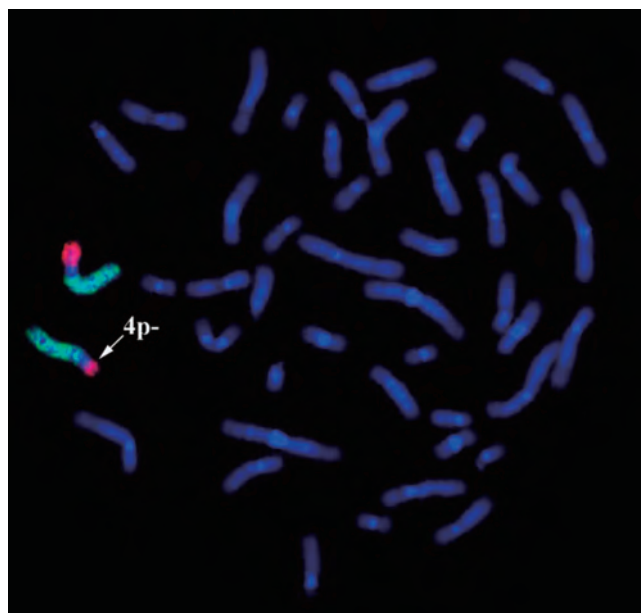


Рис. 2. Супрессионная FISH плечеспецифичных ДНК-зондов на метафазные хромосомы пациента. Сигнал FISH 4p ДНК-зонда красного цвета; сигнал FISH 4q ДНК-зонда зеленого цвета. Общее окрашивание хромосом красителем DAPI (сигнал синего цвета).

ния позволили полностью исключить наличие перicen-трической инверсии в хромосоме  $der(4)$ , сбалансированную транслокацию с вовлечением материала хромосомы 4. Также минимизирована вероятность несбалансированной транслокации с формированием  $der(4)t(4;?)$ . Теоретически можно допустить присутствие в  $der(4)$  очень небольшого района из другой хромосомы, который замаскирован сигналом ДНК-пробы РСР4p. На основании совокупности полученных данных был сделан вывод о наличии интерстициальной делеции в коротком плече одного из гомологов хромосомы 4, и кариотип пациентки был описан как  $46,XX,del(4)(p12p15.2)$ .

Таким образом, у девочки имеется частичная моносомия короткого плеча хромосомы 4. В исследованиях, посвященных структурным аномалиям, затрагивающим короткое плечо хромосомы 4, наибольший удельный вес занимают  $del(4)(p16.3)$ , ассоциированные с синдромом Вольфа—Хиршхорна. Для него характерны резкая задержка психомоторного и психического развития, микроцефалия, гипертелоризм, клювовидный нос, микрогенения, деформированные ушные раковины с преаурикулярными складками, гипотония мышц, судороги. Довольно часты расщелины верхней губы и неба, деформации стоп, эпикант, неправильной формы углубления в области крестца [10]. Критический район для развития

данного синдрома — 4p16 [11], который в нашем случае сохранен. Видимо поэтому клинические проявления у ребенка во многом отличаются от описанных для синдрома Вольфа—Хиршхорна. В нашем случае была верифицирована интерстициальная делеция (4)(p12p15.2). Из расположенных в этом регионе генов наиболее изученными являются фенотипические эффекты гена *PNOX2B*, дисфункция которого в большинстве случаев приводит к фенотипу ССНС (врожденный центральный синдром гиповентиляции или синдром проклятия Ундины, OMIM 209880). В 16% случаев он сочетается с синдромом Гиршпрунга. Наиболее распространенным типом аномалии является экспансия полиаланинового тракта, реже точковые мутации. Ген *PNOX2B* локализован в 4p12. Частота ССНС — 1:50—200 тыс. новорожденных. Подавляющее большинство случаев — это новые мутации [12]. Для ССНС также характерны стволые нарушения, включая синдром гиповентиляции. В нашем случае синдрома гиповентиляции не наблюдалось так же, как и синдрома Гиршпрунга.

В работе, посвященной изучению особенностей строения лица у 45 индивидуумов с ССНС [13], имеются краткие описания 3 случаев делеций, затрагивающих этот регион и не укладывающихся в типичную морфологическую картину синдрома. Эти три случая с перестройками в (4)(p11p15) в области гена *PNOX2B* не имели признаков альвеолярной недостаточности. Сделано предположение, что удаление гена *PNOX2B* не приводит к фенотипу ССНС, подтверждая таким образом гипотезу доминирующего отрицательного механизма действия *PNOX2B*-мутаций при ССНС, а не гаплонедостаточности. Следует отметить, что при сравнении черт лица в этих трех случаях с основной группой, разница представлялась авторам не вполне очевидной. В частности, при транслокации, сопоставимой с делецией (4)(p12p13), имелись болезнь Гиршпрунга, микроцефалия, преобладание лицевого черепа, выступающий лоб, очень короткий нос с легкой антеверсией ноздрей, высокая спинка носа, видные границы фильтра и двусторонний эпикант. В случае с делецией (4)(p11p15.2) выявлялись микроцефалия, узкое лицо, короткие глазные щели, птоз, видный носовой мостик, длинный нос и небольшие треугольные уши. При делеции (4)(p12p15) отмечались уплощение левой половины черепа, антимонолоидный разрез глаз и эпикант, деформированные уши с широкими нерегулярно уплощенными завитками, широкий корень носа, асимметрия формы носа и локализации носовой перегородки. Различия между этими описаниями и основной группой, возможно, связаны с тем, что при обширных делециях, затрагивающих другие гены, эффекты их гаплонедостаточности скрывают влияние гена *PNOX2B* на фенотип лица [13].

В 2014 г. японские исследователи описали двухлетнюю девочку с проксимальным 4p-делеционным синдромом и инфантильной эпилептической энцефалопатией, ассоциированными со сбалансированной транс-

локацией *de novo* t(4;13)(p15.2;q12.13). Пациентке был поставлен диагноз «инфантильные спазмы» в возрасте 9 месяцев. У нее были лицевые дизморфии и задержка развития [14]. Как отмечают авторы, сообщалось более чем о 20 случаях проксимального синдрома делеции 4p, но гены, поражение которых приводит к нему, остаются не идентифицированными.

Описание ещё одного случая, со схожим с нашей пациенткой фенотипом, представлено в Датской базе данных. Это 38-летняя женщина с интерстициальной делецией (4)(p15.1p15.3), легкой умственной отсталостью, эпилепсией и полимикрогирией, примыкающей к паутинной оболочке кисте левой височной доли. Делеция была установлена методом сравнительного геном-гибридизационного скрининга пациентов с эпилепсией и пороками развития головного мозга [15].

Ген *PNOX2B* кодирует высококонсервативный фактор транскрипции гомеобоксного домена с ранним эмбриологическим действием в качестве активатора транскрипции в продвижении паннейрональной дифференцировки, а также он подавляет экспрессию ингибиторов нейрогенеза. Нарушения этого механизма приводят к «нейрокриптопатии», то есть болезнь связана с дефектами нервного гребня, которые могут влиять на формирование специфических лицевых структур и приводить к стволым неврологическим нарушениям. Возможно, что различные варианты поражений региона (4)(p11p15) порождают спектр фенотипов, общим для которых является не столько специфичность лица, а, в большей степени, нарушение стволной дифференцировки.

*Случай 2.* Двухлетний мальчик с предварительным диагнозом «расщелина мягкого неба», которому при кариотипировании в одной из лабораторий на Дальнем Востоке был поставлен диагноз «трисомия хромосомы 22». Ребенок от второй беременности (в семье есть здоровая девочка). При рождении отмечалась задержка внутриутробного развития по гипопластическому типу. Мальчик наблюдался у невролога с диагнозом: *церебральная ишемия 2 степени, синдром двигательных, вегето-висцеральных дисфункций*. Отмечается задержка психомоторного развития: удержание головы с 7 мес., сидеть стал с 1 года, на момент осмотра (2 года) ходит с поддержкой. Говорит 5—6 простых слов, на обращенную речь не реагирует.

Телосложение правильное, нормостеническое. Рост-весовые показатели в пределах возрастной нормы. При осмотре отмечены малые аномалии развития: микроцефалия, высокий лоб, гипертелоризм, монголоидный разрез глаз, широкое уплощенное переносье, эпикант, маленький короткий нос, рот «карпа», низкое расположение ушных раковин, макротрия, сходящееся косоглазие, клинодактилия 5-х пальцев кистей, конусовидная деформация концевых фаланг кистей. Нижние конечности с вальгусной деформацией, частичная кожная син-

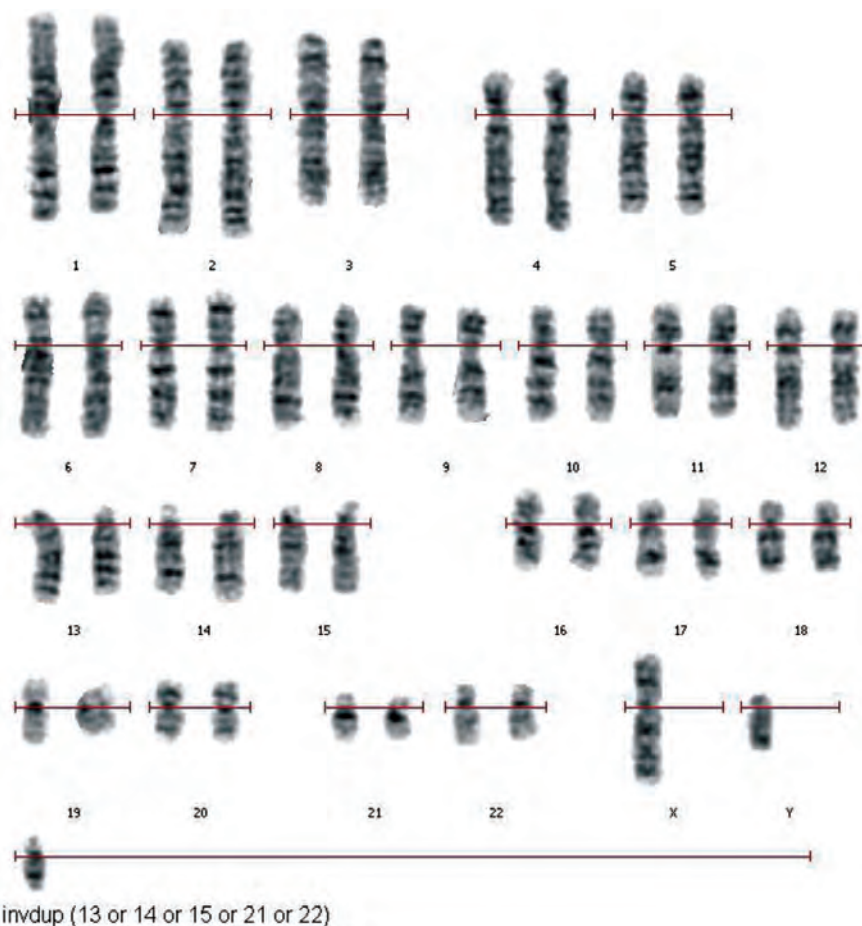


Рис. 3. Случай выявления МХ. Кариограмма, G-окрашивание.



Рис. 4. Схема образования бисателлитного дицентрика.

дактилия 2—3 пальцев стоп. Двусторонний крипторхизм. Расщелина мягкого неба. По результатам эхокардиографии отмечены малые сердечные аномалии: добавочная хорда левого желудочка, открытое овальное окно.

Наблюдаемая у пациента клиническая картина не соответствовала таковой при трисомии хромосомы 22 (синдроме «кошачьего глаза»). В частности, у ребенка не наблюдались колобома радужки и атрезия ануса, характерные для данного синдрома [10]. Кроме того, у него были выявлены макроцефалия и маленький короткий нос, в то время как для синдрома «кошачьего глаза» характерны микроцефалия и клювовидный нос. Поэтому врач-генетик направил мальчика на повторное кариотипирование.

При повторном исследовании в цитогенетической лаборатории Центра персонализированной медицины (г. Новосибирск) дополнительная хромосома была охарактеризована как малая сверхчисленная МХ, имитирующая хромосому 22 (рис. 3).

Около 80% малых сверхчисленных МХ человека происходят из акроцентрических хромосом. Их основная часть представляет производные хромосомы 15 (около 60%) [16]. Они были найдены как у фенотипиче-

ски нормальных пациентов, так и у пациентов с задержкой умственного развития. Часто в их состав входят две копии коротких плеч хромосомы 15, находящихся в инвертированной ориентации: inv dup(15). Формирование МХ связано с разрывами хромосом и их ошибочной репарацией (рис. 4). В случае акроцентрических хромосом в результате разрыва и дупликации формируется изохромосома, содержащая две копии короткого плеча, центромерного района и участка хромосомы между центромерным районом и точкой разрыва. Одна из центромер такой маркерной хромосомы инактивируется. В зависимости от локализации точки разрыва МХ может содержать различные эухроматиновые сегменты исходной хромосомы [17].

Большинство МХ, ассоциированных с врожденными пороками развития и умственной отсталостью, характеризуются наличием эухроматиновых сегментов [18]. Конкретное содержание таких сегментов в МХ и определяет их клиническое значение. Поэтому детекция эухроматиновых сегментов в МХ и идентификация их материала является важной задачей цитогенетической диагностики.

Морфологически выявленная у ребенка МХ соответствовала инвертированной дупликации одной из акроцентрических хромосом. Это подтвердили два дополнительных вида дифференциального окрашивания хромосом. С-окрашивание выявило блоки гетерохроматина (рис. 5а), Ag-NOR-окрашивание —

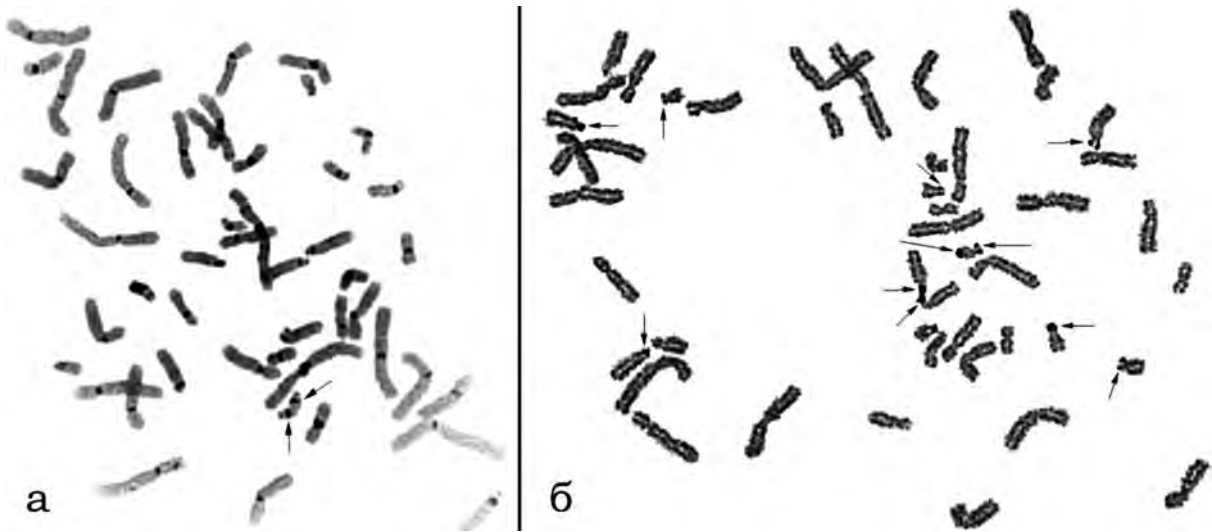


Рис. 5. Случай выявления МХ.

а) С-окрашивание. Стрелки указывают на гетерохроматиновые районы в обоих плечах МХ.

б) Серебрение. Длинные стрелки указывают на районы ядрышковых организаторов в обоих плечах МХ. Короткие стрелки указывают на районы ядрышковых организаторов других акроцентрических хромосом.

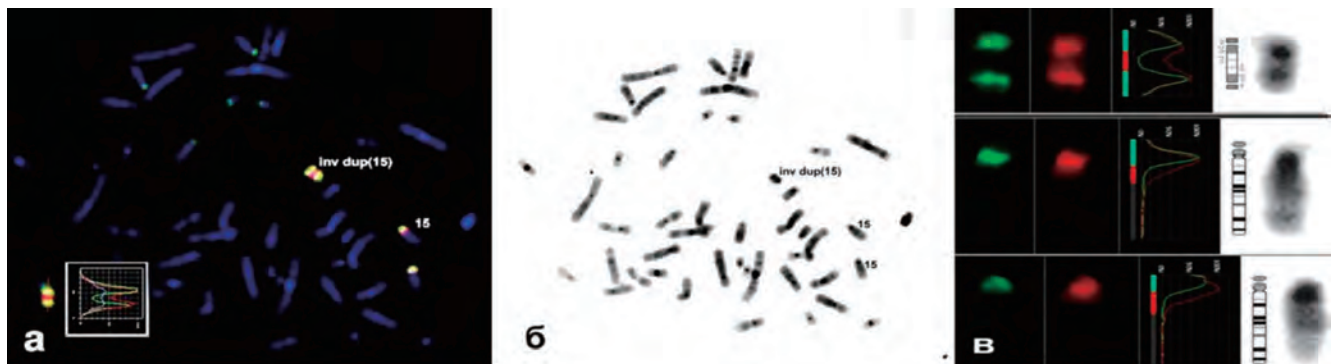


Рис. 6. Молекулярная диагностика для выявления происхождения и состава МХ.

а) Двухцветная FISH районспецифичных ДНК-проб, полученных из охарактеризованных ранее МХ inv dup(15) с метафазными хромосомами пациента. Зеленый сигнал — сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы, специфичной району 15(pter→q11.1). Красный сигнал — сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы, специфичной району 15(pter→q13). Синий сигнал — окраска ДНК красителем DAPI. inv dup (15) — указывает на МХ. 15 — нормальные гомологи хромосомы 15. Слева, внизу представлены профили интенсивностей двух FISH сигналов по длине МХ пациента.

б) Инвертированный DAPI бэндинг.

в) Профили интенсивностей сигналов на МХ inv dup(15) и гомологах хромосомы 15.

районы ядрышковых организаторов на обоих плечах МХ (рис. 5б).

Определить точное происхождение МХ вследствие ее малого размера классическими цитогенетическими методами невозможно, но эти методы позволили сузить круг поиска исходной хромосомы до пяти акроцентрических хромосом. Кариотип ребенка был описан как 47,XY,+inv dup(13 or 14 or 15 or 21 or 22). Результаты супрессионной гибридизации *in situ* микродиссекционных ДНК-проб, приготовленных из двух ранее охарактеризованных маркерных хромосом inv dup(15)(q11) и inv dup(15)(q13) (рис. 6 а—в), позволили описать МХ как inv dup(15)(q13). ДНК-проба, приготовленная из inv dup(15)(q11), окрашивала район 15(pter→q11), т.е. короткое плечо и С-позитивный прицентромерный район хромосомы 15. ДНК-проба, приготовленная из inv dup(15)(q13), окрашивала район 15(pter→q13). Таким образом, район хромосомы, в котором выявляется сигнал только ДНК-пробы из inv dup(15)(q13), соответствует эухроматиновому району 15(q12→q13).

В результате проведенных исследований сигнал ДНК-пробы inv dup(15)(q11) был выявлен в районе 15(pter→q11) и в дистальных районах МХ пациента (зеленый сигнал), а сигнал ДНК-пробы inv dup(15)(q13) был выявлен в районе 15(pter→q13) и на всей МХ пациента (красный сигнал). Таким образом, часть МХ была окрашена только ДНК-пробой, полученной из inv dup(15)(q13), что указывает на наличие в ее составе района 15(q12→q13). Полученные результаты позволили сделать заключение о происхождении МХ из хромосомы 15. МХ представляет собой inv dup(15)(q13), кариотип пациента был описан как 47,XY,+inv dup(15)(q13).

Ранее было показано, что присутствие inv dup(15)(q13) в клетках пациентов связано с развитием синдрома inv dup(15): задержка умственного и общего развития, гипотония, нарушение поведенческих реакций, эпилептические припадки, аномальная дерматоглифика, соматические нарушения [19]. Клинические проявления у пациента, в основном, соответствуют описанным в литературе.

Одним из важных вопросов, встающих перед исследователем при проведении цитогенетической и молекулярно-цитогенетической диагностики, является вопрос достаточности проведенной диагностики. В конкретных случаях он касается дальнейшего уточнения локализации точки разрыва. Более точно локализация точек разрыва при хромосомных перестройках может быть определена при полногеномном секвенировании или сравнительной геномной гибридизации на соответствующих микрочипах. К сожалению, такое уточнение может не дать врачу-генетику дополнительной полезной информации для проведения консультирования пациента или его родителей. Проблема может заключаться не только в отсутствии информации о последствиях такой хромосомной перестройки, но также и в различном ее проведении на разном генетическом фоне. Т.е., в подобных

случаях пациент оказывается незаинтересованным в проведении уточняющей диагностики. Заинтересованной стороной в этом случае оказывается сообщество генетиков, так как получение информации, включающей точную локализацию точек разрыва при формировании хромосомных перестроек и полное описание генома пациента, полученное при полногеномном секвенировании, в будущем позволит получить базу данных, дающую возможность перейти на принципиально новый, более высокий уровень медико-генетического консультирования.

Следует отметить, что подход к вопросу о необходимости продолжения диагностики и уточнения локализации точек разрыва должен быть строго индивидуальным. Уже сегодня переход в локализации точки разрыва с бэнда или суббэнда хромосомы на последовательности ДНК в сиквенсе генома человека, может иметь принципиальное значение. Примером такой перестройки может служить делеция дистального района короткого плеча хромосомы 3. Проявление делеции 3pter→p25 варьирует от серьезных аномалий развития до близкого к нормальному фенотипу [20] в зависимости от локализации точки разрыва в 3p25. В этом и подобных ему случаях необходимо проведение исследований, уточняющих локализацию точки разрыва.

### Список литературы

1. Захаров АФ, Бенюш ВА, Кулешов НП, Барановская ЛИ. Хромосомы человека (атлас). М.: Медицина. 1982; 263 с.
2. Goodpasture C, Bloom SE Visualization of nucleolar organizer regions. III. Mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma. 1975;53:37-50.
3. Баранов ВС, Кузнецова ТВ. Цитогенетика эмбрионального развития. СПб: Издательство Н-Л. 2007; 640 с.
4. Henegariu O, Heerema N, Wright I, Bray-Ward P et al. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. Cytometry. 2001;43:101-109.
5. Rubtsov N, Karamysheva T, Babochkina T et. al. A new simple version of chromosome microdissection tested by probe generation for 24-multi-color FISH, multi-color banding (MCB), ZOO-FISH and in clinical diagnostics. MedGen. 2000;12:65.
6. Карамышева ТВ, Матвеева ВГ, Шорина АР, Рубцов НБ. Клинический и молекулярно-цитогенетический анализ редкого случая мозаицизма по частичной моносомии 3p и частичной трисомии 10q у человека. Генетика. 2001;37(3):1-6.
7. Telenius H, Carter NP, Bebb CE. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by single degenerate primer. Genomics. 1992;13:718-725.
8. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet. 1988;80:224-234.
9. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Karger. 2009.
10. Ворсанова СГ, Юров ЮБ, Чернышов ВН. Медицинская цитогенетика. М: «Медпрактика-М». 2006;300 с.



11. Wilson MG, Towner JW, Coffin GS et al. Genetic and clinical studies in 13 patients with the Wolf-Hirschhorn syndrome del(4p). *Hum. Genet.* 1981;59:297-307.
12. Central Hypoventilation Syndrome — Patient and Carer Information Booklet — edited by the EUCHS Consortium — 1st edition 2012.
13. Todd ES, Weinberg SM, Berry-Kravis EM et al. Facial Phenotype in Children and Young Adults with PHOX2B-Determined Congenital Central Hypoventilation Syndrome: Quantitative Pattern of Dys-morphology. *Pediatric Research.* 2006;59:39-45.
14. Nakayama T, Saitsu H, Endo W et al. RBPJ is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. *Brain. Dev.* 2014 Jun;36(6):532-536.
15. Moller RS, Hansen CP, Jackson GD et al. Interstitial deletion of chromosome 4p associated with mild mental retardation, epilepsy and polymicrogyria of the left temporal lobe. *Clinical Genetics.* 2007;72(6):593-598.
16. Blennow E, Bui TH, Kristoffersson U et al. Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat. Diagn.* 1994;14(11):1019-1028.
17. Рубцов НБ, Карамышева ТВ, Гайнер ТА, Шкляева ОА. Анализ маркерных хромосом: ДНК пробы для оценки возможного клинического значения маркерной хромосомы. *Медицинская генетика.* 2003;2(12):520-527.
18. Wandstrat AE, Schwartz S. Isolation and molecular analysis of inv dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. *Chromosoma.* 2000;109(7):498-505.
19. Webb T, Hardy CA, King MA et al. A clinical, cytogenetic and molecular study of ten probands with supernumerary inv dup (15) marker chromosomes. *Clin. Genet.* 1998; 53(1):34-43.
20. Kariya S, Aoji K, Akagi H et al. A terminal deletion of the short arm of chromosome 3: karyotype 46, XY, del (3) (p25-pter); a case report and literature review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2000;56(1):71-8.

# Спонтанная хромосомная нестабильность в клетках с кольцевой хромосомой как основа хромосомной терапии

Кашеварова А.А.<sup>1\*</sup>, Беляева Е.О.<sup>1</sup>, Никонов А.М.<sup>2</sup>, Плотникова О.В.<sup>2</sup>, Гергерт И.Г.<sup>3</sup>, Никитина Т.В.<sup>1</sup>, Скрябин Н.А.<sup>1</sup>, Мензоров А.Г.<sup>4</sup>, Гридина М.М.<sup>4</sup>, Васильев С.А.<sup>1</sup>, Лопаткина М.Е.<sup>1</sup>, Савченко Р.Р.<sup>1</sup>, Чурилова А.В.<sup>5</sup>, Толмачева Е.Н.<sup>1</sup>, Серов О.Л.<sup>4</sup>, Назаренко Л.П.<sup>1</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск

<sup>2</sup> Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Диагностический центр Алтайского края», Барнаул

<sup>3</sup> Алтайский Краевой Клинический Перинатальный центр «Дар», Барнаул

<sup>4</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск

<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

\* e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Протяженные хромосомные аберрации часто являются причиной задержки психомоторного развития, интеллектуальных нарушений и врожденных пороков развития. Несмотря на высокую частоту мутаций, вовлекающих, как правило, нескольких генов, а также большое разнообразие самих хромосомных аномалий, в настоящее время не существует способов эффективного лечения таких пациентов. Цель — изучение спонтанной хромосомной нестабильности у пациентов с кольцевыми хромосомами в дифференцированных и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК). У пациентов с интеллектуальными нарушениями и аномалиями развития в ходе стандартного кариотипирования выявлены кольцевые хромосомы 13 и 22. С использованием микрочипов Agilent 860K в кариотипе пробандов идентифицирован ряд дополнительных хромосомных мутаций. ИПСК получены путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов (KLF4, OCT4, SOX2 и с-MYC человека) из фибробластов кожи. У пациентов идентифицированы терминальные делеции 13q34 и 22q13.32-q13.33, обусловившие образование кольцевых хромосом 13 и 22, соответственно. Методом FISH-анализа подтверждено наличие кольцевых хромосом и установлено, что доля лимфоцитов с моносомией по хромосоме 13 составила 47%, по хромосоме 22 — 8%. На первом пассаже 50% и 24% фибробластов оказались моносомными по хромосомам 13 и 22 соответственно. На 9 пассаже зарегистрировано 56% фибробластов с моносомией по хромосоме 13. Среди лимфоцитов и фибробластов на 9 пассаже 1,8% и 1% клеток соответственно имели нормальный кариотип. К 33 пассажу число фибробластов с моносомией по хромосоме 22 достигло 44% и статистически значимо превысило исходный уровень ( $p < 0,05$ ). Доля ИПСК, моносомных по хромосоме 22, варьировала в пределах 6,3–17% для разных клонов. Наличие моносомных клеток у пациентов с кольцевой хромосомой указывает на хромосомную нестабильность уже *in vivo*. *In vitro* наблюдается статистически значимое увеличение числа клеток с моносомией по хромосоме 22. Клетки с нормальным кариотипом могут являться свидетельством процессов коррекции хромосомного дефекта, что лежит в основе начинающей разрабатываться так называемой «хромосомной терапии» генетических заболеваний.

**Ключевые слова:** интеллектуальные расстройства, кольцевые хромосомы, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, хромосомная нестабильность, хромосомная терапия.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Экспериментальная часть исследования выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-10231. Клиническое обследование пациентов проведено в рамках темы поисковых научных исследований «Разработка алгоритма молекулярно-цитогенетической диагностики кольцевых хромосом у пациентов с множественными врожденными пороками развития и задержкой интеллектуального развития» государственного задания ФАНО РФ для НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

## Spontaneous chromosomal instability in cells with a ring chromosome as the basis for chromosomal therapy

Kashevarova A.A.<sup>1\*</sup>, Belyaeva E.O.<sup>1</sup>, Nikonov A.M.<sup>2</sup>, Plotnikova O.V.<sup>3</sup>, Gergert I.G.<sup>3</sup>, Nikitina T.V.<sup>1</sup>, Skryabin N.A.<sup>1</sup>, Menzorov A.G.<sup>4</sup>, Gridina M.M.<sup>4</sup>, Vasilyev S.A.<sup>1</sup>, Lopatkina M.E.<sup>1</sup>, Savchenko R.R.<sup>1</sup>, Churilova A.V.<sup>5</sup>, Tolmacheva E.N.<sup>1</sup>, Serov O.L.<sup>4</sup>, Nazarenko L.P.<sup>1</sup>, Lebedev I.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk

<sup>2</sup> Diagnostic Center of the Altai Region, Barnaul

<sup>3</sup> Altai Regional Clinical Perinatal Center «Dar», Barnaul

<sup>4</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>5</sup> Tomsk State University, Tomsk

\* e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

**Introduction:** Extensive chromosomal aberrations are often associated with psychomotor development delay, intellectual disability, and congenital malformations. Despite the high frequency of mutations and due to the involvement, as a rule, of several genes, as well as the wide variety of chromosomal abnormalities themselves, there are currently no ways to effectively treat such patients. **Aim:** To study spontaneous chromosomal instability in patients with ring chromosomes in differentiated and induced pluripotent stem cells (iPSC). **Materials and methods:** In patients with intellectual disability and developmental abnormalities, ring chromosomes 13 and 22 were identified during standard karyotyping. A number of additional chromosomal mutations in their karyotype were identified using Agilent 860K microarrays. FISH analysis confirmed ring chromosomes and found mosaicism for them in lymphocytes, fibroblasts, and iPSCs of the patients. iPSCs were obtained from skin fibroblasts by exogenous expression of transcription factors (KLF4, OCT4, SOX2, and human c-MYC). **Results:** Terminal 13q34 and 22q13.32-q13.33 deletions were identified in patients, resulting in the formation of ring chromosomes 13 and 22, respectively. FISH analysis confirmed the presence of ring chromosomes and found that 47% and 8% of lymphocytes of the patients had monosomies 13 and 22, respectively. At the first passage 50% and 24% of the fibroblasts were monosomic for chromosomes 13 and 22, respectively. On the 9<sup>th</sup> passage 56% of fibroblasts demonstrated monosomy 13. Among the lymphocytes and fibroblasts at the 9th passage, 1.8% and 1% of the cells, respectively, had a normal karyotype. By the 33<sup>rd</sup> passage, the number of fibroblasts with monosomy 22 reached 44% and statistically significantly exceeded the initial level ( $P < 0.05$ ). The proportion of iPSC monosomic for chromosome 22 varied between 6.3–17% for different clones. **Conclusion:** The presence of monosomic cells in patients with a ring chromosome indicates chromosomal instability already in vivo. In vitro a statistically significant increase in the number of cells with monosomy 22 is observed. Cells with normal karyotype can be evidence of chromosomal defect correction processes, which are the basis of the chromosomal therapy of genetic diseases that is beginning to be developed.

**Key words:** intellectual disability, ring chromosomes, induced pluripotent stem cells, chromosomal instability, chromosomal therapy.

Интеллектуальные расстройства в детском возрасте в среднем в разных популяциях встречаются с частотой 1–3% [1]. Причинами данной патологии являются как средовые, так и генетические факторы. Последние обуславливают заболевание у 50–60% пациентов. Несмотря на значительный прогресс в области клинической и молекулярной диагностики интеллектуальных нарушений, определение генетических причин заболевания все еще остается проблемным вследствие их гетерогенности, в результате которой различные генетические нарушения приводят к клинически трудноразличимым фенотипам. По последним данным, более 800 генов участвуют в патогенезе синдромальных и несиндромальных форм интеллектуальных расстройств, в то время как по предварительным оценкам в геноме таких генов может насчитываться около 2000 [2]. Учитывая огромное количество вовлеченных генов и клинический полиморфизм заболеваний, на сегодняшний день для них нет специфической терапии, а пациентам может быть предложено только симптоматическое облегчение состояния.

Недавно была высказана идея о так называемой «хромосомной терапии» заболеваний, обусловленных протяженными хромосомными мутациями. В ее основу лег феномен потери кольцевой хромосомы при культивировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных из фибробластов пациентов с микроделеционными синдромами, возникшими вследствие терминальной хромосомной микроделеции при образовании кольца [3, 4]. Дальнейшее удвоение оставшегося нормального гомолога может привести к нормализации числа и структуры хромосом в кариотипе, а направленная дифференцировка ИПСК с редактированным кариотипом в заданный тип клеток может составить основу заместительной клеточной терапии. Данная идея инициировала настоящее исследование, целью которого явилось изучение особенностей спонтанной хромосомной нестабильности у пациентов

с кольцевыми хромосомами в дифференцированных клетках и ИПСК.

### Материалы и методы

Лимфоциты периферической крови и фибробласты кожи были получены от пробандов с интеллектуальными нарушениями и аномалиями развития, у которых методом стандартного кариотипирования были выявлены кольцевые хромосомы 13 и 22. С использованием микрочипов Human Genome CGH Microarray Kits 8 x 60K (Agilent Technologies, США) проведено исследование точек разрывов делеций, обусловивших замыкание хромосом в кольцо, а также полногеномный поиск других возможных генетических аномалий [5]. Интерпретация CNVs проведена с использованием базы данных геномных вариантов (DGV) [6] и онлайн-версии каталога наследственных болезней «Менделевское наследование у человека» (OMIM) [7]. Патогенетически значимые CNV подтверждены методом ПЦР в реальном времени, и определено их происхождение. Последовательности праймеров приведены в табл. 1. В качестве контрольного локуса был использован ген *HEXB* (5q13.3).

Структура кольцевых хромосом и их частота при культивировании лимфоцитов периферической крови, первичной культуры фибробластов кожи и полученных из них ИПСК исследованы FISH-методом с зондами на центромеры хромосом 13/21 (D13Z1/D21Z1), 14/22 (D14Z1/D22Z1), субтеломерным зондом 13q и зондом на ген *TBC1D22A*, локализованный в дистальной области длинного плеча хромосомы 22 и попавший в область микроделеции при образовании кольцевой хромосомы. Клоны *E.coli*, несущие плазмиды со вставками центромероспецифичных альфа-сателлитных последовательностей ДНК, а также ВАС-клон bA569D были любезно предоставлены профессором М. Роччи (Resources for Molecular Cytogenetics, Институт генетики г. Бари, Ита-

лия). Зонд на ген *TBC1D22A* был получен в ходе ПЦР длинных фрагментов (набор BioLabMix, Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Зонды 13q, 14/22 и 13/21, *TBC1D22A* были мечены TAM-RA-dUTP и Fluorescein-dUTP соответственно (BioSan, Россия).

Фибробласты кожи пациентов с кольцевыми хромосомами 13 и 22 трансдуцированы в ИПСК путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC человека в клетках-мишенях с использованием лентивирусных векторов LeGO. Эти векторы содержат транскрипционные факторы человека и репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, *GFP*). Использование гена *GFP* позволяло оценивать эффективность трансфекции фибробластов лентивирусами по свечению зеленого флуоресцентного белка. Получение ИПСК проводили по протоколу, предложенному группой Яманака [8], с модификациями, увеличивающими эффективность перепрограммирования, в частности с использованием вальпроевой кислоты — ингибитора гистоновых деацетилаз и ряда других низкомолекулярных ингибиторов.

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики

Томского НИМЦ. Информированное согласие от родителей пробандов получено. Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

### Результаты и обсуждение

Спектр известных на сегодняшний день патогенных хромосомных вариаций чрезвычайно разнообразен; уже 27 тыс. мутаций представлено в базе данных геномных вариантов и фенотипов DECIPHER [9]. Если обратиться к списку основных симптомов микроделеционных и микродупликационных синдромов, описанных в каталоге OMIM, доминирующими среди них будут нарушения интеллектуального развития, поведения, речи, аномалии формы черепа, неспецифические лицевые аномалии, аномалии скелета и др. В подавляющем большинстве случаев эти аномалии обусловлены протяженной мутацией, затрагивающей много генов, фенотипические эффекты которых и пути взаимодействия могут оставаться неясными. В связи с этим, для оказания эффективной помощи больному кажется целесообразным раз-

Таблица 1

Структура праймеров для ПЦР в реальном времени и синтеза зондов для FISH-анализа

Регион	Праймер	Последовательность	Анализ
3q12.2	ADGRG7ex12 F	5'-TGCAGACAAGTGATGGTGAC-3'	ПЦР в реальном времени
	ADGRG7ex12 R	5'-ATAGTGCAGTAAGCGGCAA-3'	
3q13.31	TUSC7 F	5'-GAGCCAGCTTCACTGGAAAC-3'	
	TUSC7 R	5'-CCCTGTGGCTCTACAAGAGG-3'	
5q13.3	HEXB F	5'-CCGGGCACAATAGTTGAAGT-3'	
	HEXB R	5'-TCCTCCAATCTTGTCCATAGC-3'	
13q34	CHAMP1 F	5'-CCACCAGAACTCCGAAAGAC-3'	
	CHAMP1 R	5'-TTGCGAAGCTCTGGAGACA-3'	
22q13.32-q13.33	FAM19A5ex4 F	5'-TGAGGTTGGGTTTGTTCATCA-3'	
	FAM19A5ex4 R	5'-CTGCCCTCGAAGGTGTCTAC-3'	
	SHANK3ex2 F	5'-CAGGACGCGCTCAACTATG-3'	
	SHANK3ex2 R	5'-GGTTGGGCGGGTACTCCT-3'	
	ACRex2 F	5'-GGTTACGGTTCAGGCAAAC-3'	
	ACRex2 R	5'-AGTGAGCACCCATCGTGAAT-3'	
22q13.31	TBC1D22A F1	5'-TTGTGGTGGAGCACCTGTTT-3'	FISH
	TBC1D22A R1	5'-AAGCAGCCAATGACCCTCTC-3'	
	TBC1D22A F2	5'-TGACCACCATCCTCATGCAC-3'	
	TBC1D22A R2	5'-AGATTCAGCAGACGCACCAA-3'	
	TBC1D22A F3	5'-CAATCCTCCCGTGCTATCCC-3'	
	TBC1D22A R3	5'-AGGCGAGATGACGCATAAGG-3'	
	TBC1D22A F4	5'-CCTTTGTGGGATGGGATGCT-3'	
	TBC1D22A R4	5'-GCGCCTCCCTTAGTGATACC-3'	

работать универсальный метод коррекции хромосомных дефектов. В основу такого метода может лечь описанный недавно феномен потери кольцевой хромосомы при культивировании ИПСК, полученных из фибробластов самого пациента, с последующей дубликацией нормального гомолога и восстановлением хромосомного набора [3, 4, 10].

Нами в рамках разработки технологий хромосомной терапии ведется изучение спонтанной хромосомной нестабильности у пациентов с кольцевыми хромосомами 13 и 22 в дифференцированных клетках (лимфоциты периферической крови и фибробласты кожи) и ИПСК. Ниже мы приводим результаты клинических и молекулярно-цитогенетических исследований двух пациентов.

*Случай 1.* Пациент Г. с кольцевой хромосомой 13. Возраст 17 лет. На момент осмотра вес 93 кг (97 процентиль), рост 178 см (50–75 процентиль), окружность головы 58 см (98 процентиль). Отмечены глубоко посаженные глаза, изогнутая верхняя губа, аномальный рост волос на макушке, волосы жесткие, светлые, избыточный рост волос на предплечьях, микроорхидизм, сандалевидная щель стопы. В связи с задержкой полового развития состоит на учете у эндокринолога и андролога с диагнозом *гипоталамический синдром пубертатного периода на фоне резидуально-органического заболевания головного мозга с задержкой полового развития, средняя степень тяжести, перманентное течение; ожирение второй степени* [11].

В возрасте 9 лет пробанд был направлен на цитогенетическое исследование, в результате которого в периферической крови ребенка выявлена кольцевая хромосома 13 (кариотип — 46,XY,r(13)(p13q34)) (рис. 1). Для уточнения границ делеции, повлекшей за собой образование кольца, нами проведен aCGH-анализ и дополнительно выявлены микроделеция в области 13q34 (1,924 млн п.н.) и трипликация 3q12.2 (74 т.п.н.) (рис. 2). Клиническая значимость амплификации области 3q12.2 на сегодняшний день не ясна. Она выявляется как у относительно здоровых людей, так и у онкологических больных [12]. Данная трипликация приводит к образованию химерного транскрипта TFG-GPR128. Мутации в гене *TFG* (OMIM 602498) ассоциированы с нарушением белковых секреторных путей и функций периферической нервной системы. Методом ПЦР в реальном времени показано, что микроделеция возникла *de novo*, а трипликация имеет отцовское происхождение (рис. 3). В первичной культуре фибробластов кожи aCGH также выявил микроделецию 13q34 (2,099 млн п.н.), но дополнительно еще и моносомию по хромосоме 13 (рис. 4). Методом FISH с зондами на центромерные регионы хромосом 13 и 21 и субтеломерную область длинного плеча хромосомы 13 подтверждено наличие кольцевой хромосомы и обнаружено, что 50% фибробластов моносомны по хромосоме 13 (табл. 2, рис. 5). Далее моносомия 13 нами была также выявлена

в 47% культивированных лимфоцитов и 56% фибробластов на 9 пассаже (табл. 2). Полученные результаты указывают на то, что в ходе клеточного деления теряется именно кольцевая хромосома. Судя по высокому проценту моносомного клона, можно предположить, что потеря кольца произошла довольно давно, что привело к дальнейшей пролиферации двух клонов — дисомного и моносомного. Кроме того, обращает на себя внимание наличие небольшого количества клеток с нормальным кариотипом — 1,8% в лимфоцитах и 1% в фибробластах на пассаже 9, что может быть результатом потери кольцевой хромосомы 13, амплификации нормального гомолога и, следовательно, коррекции кариотипа. Именно этот спонтанный процесс и может лечь в основу разрабатываемой хромосомной терапии.

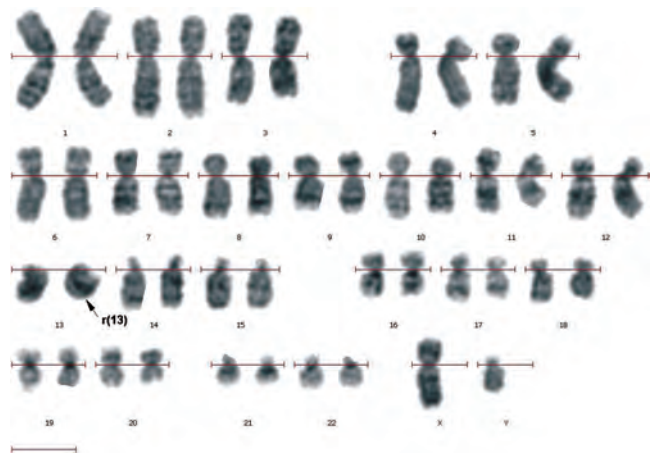


Рис. 1. Кариограмма пациента 1. Стрелкой отмечена кольцевая хромосома 13.

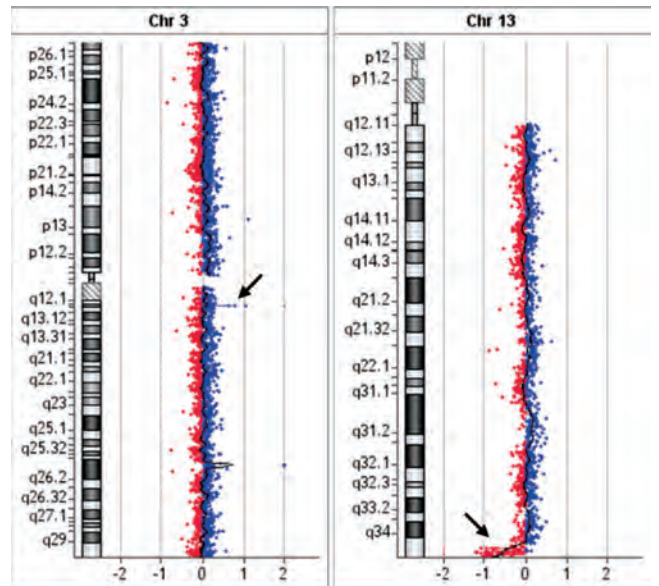


Рис. 2. aCGH профили хромосом 3 и 13 в лимфоцитах пациента 1. Стрелками отмечены трипликация 3q12.2 и микроделеция 13q34.

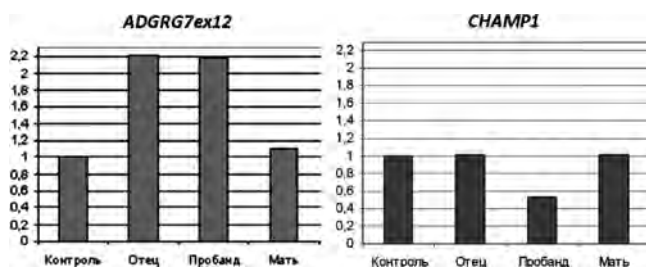


Рис. 3. Результаты ПЦР в реальном времени семьи пациента 1 с праймерами на гены *ADGRG7ex12* (trip3q12.1), *CHAMP1* (del13q34).

*Случай 2.* Пациентка 3. с кольцевой хромосомой 22. Возраст 4 года. Вес — 14,5 кг (25 перцентиль), рост — 108 см (95 перцентиль). Телосложение астеническое, узкое туловище. Из фенотипических особенностей отмечаются микроцефалия (окружность головы 45,5 см, <2 перцентиль), выступающие лобные бугры, скошенный затылок, прямые брови, монголоидный разрез глаз, эпикант, телекант, широкая, запавшая переносица, мясистый кончик носа, сглаженный фильтр, тонкая верх-

няя губа, короткая шея, широкое пупочное кольцо, брахидактилия I и V пальцев кистей рук и всех пальцев ног, утолщенная дистальная фаланга больших пальцев кистей и стоп, плоско-вальгусная стопа, крестцовокопчиковая ямка. Обследование затруднено из-за беспокойства и выраженной активности девочки. На МРТ головного мозга визуализирована картина варианта Денди—Уолкера [13].

В возрасте двух лет ребенок был направлен на цитогенетическое исследование. Была выявлена кольцевая хромосома 22 (кариотип — 46,XX,r(22)) (рис. 6). Позднее нами был проведен aCGH-анализ и идентифицирована микроделеция 22q13.32-q13.33 (рис. 7), обусловившая образование кольцевой хромосомы 22. Делеция подтверждена в ходе ПЦР в режиме реального времени; она возникла *de novo* (рис. 8). Для подтверждения кольцевой структуры хромосомы 22 был проведен FISH-анализ с зондом к центромерооспецифичной альфа-сателлитной последовательности хромосомы 22. Однако, анализируя результат гибридизации, мы обнаружили два неодинаковых по величине и интенсивности сигнала: один сигнал был крупный и

Результаты интерфазного FISH-анализа лимфоцитов и фибробластов кожи пациента 1 с кольцевой хромосомой 13

Таблица 2

Тип клеток/ Продолжительность культивирования или номер пассажа	Число и сочетание сигналов	Число клеток	Интерпретация	%
Лимфоциты/72 ч	CEN13/21 x 2, 13q x 1	3	Моносомия 13 и 21 или кольцевая хромосома 13 и нулисомия 21	1,76
	CEN13/21 x 3, 13q x 1	80	Моносомия 13	47,06
	CEN13/21 x 4, 13q x 1	80	Кольцевая хромосома 13	47,06
	CEN13/21 x 5, 13q x 1	3	Кольцевая хромосома 13 и трисомия 21 или две кольцевых хромосомы 13	1,76
	CEN13/21 x 3, 13q x 2	1	Моносомия 21	0,59
	CEN13/21 x 4, 13q x 2	3	Нормальный кариотип	1,76
	Всего	170		
Фибробласты/П1	CEN13/21 x 2, 13q x 1	3	Моносомия 13 и 21 или кольцевая хромосома 13 и нулисомия 21	2,27
	CEN13/21 x 3, 13q x 1	66	Моносомия 13	50,00
	CEN13/21 x 4, 13q x 1	61	Кольцевая хромосома 13	46,21
	CEN13/21 x 5, 13q x 1	1	Кольцевая хромосома 13 и трисомия 21 или две кольцевых хромосомы 13	0,76
	CEN13/21 x 3, 13q x 0	1	Кольцевая хромосома 13 и отсутствие нормального гомолога хромосомы 13	0,76
	Всего	132		
Фибробласты/П9	CEN13/21 x 2, 13q x 1	6	Моносомия 13 и 21 или кольцевая хромосома 13 и нулисомия 21	2,97
	CEN13/21 x 3, 13q x 1	113	Моносомия 13	55,94
	CEN13/21 x 4, 13q x 1	78	Кольцевая хромосома 13	38,61
	CEN13/21 x 5, 13q x 1	2	Кольцевая хромосома 13 и трисомия 21 или две кольцевых хромосомы 13	0,99
	CEN13/21 x 3, 13q x 2	1	Моносомия 21	0,49
	CEN13/21 x 4, 13q x 2	2	Нормальный кариотип	0,99
	Всего	202		

яркий, а второй — очень мелкий, практически невидимый. Оказалось, что причиной данного эффекта может быть частый гетероморфизм гомологов хромосомы 22 по содержанию данных альфа-сателлитов [14]. Об этой биологической особенности хромосомы 22 следует помнить при использовании данного зонда во избежание ложноположительного результата. В случае с нашей пациенткой зонд, специфичный исключительно к центромере хромосомы 22, был неинформативен, поэтому в дальнейшем нами был использован зонд, гибридизующийся на центромерах хромосом 14 и 22 (рис. 9).

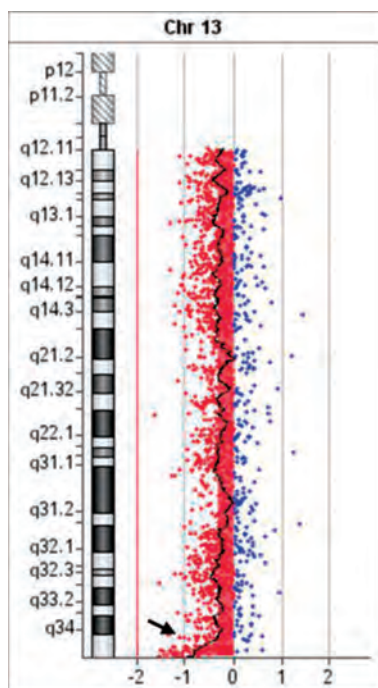


Рис. 4. aCGH профиль, демонстрирующий моносомию хромосомы 13 в фибробластах кожи пациента 1. Стрелкой отмечена микроделеция 13q34.

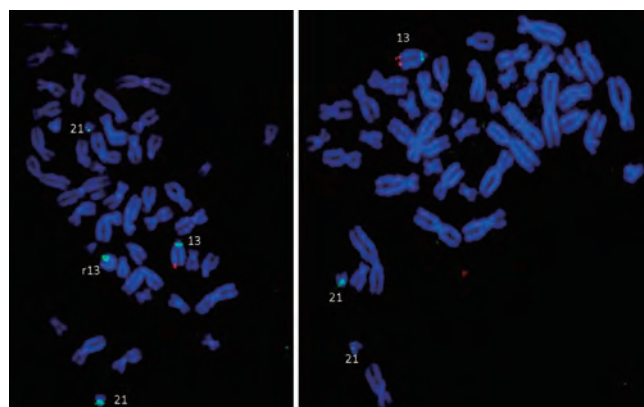


Рис. 5. FISH-анализ фибробластов кожи пациента 1. Кольцевая хромосома 13 (слева) и моносомия 13 (справа). Использованы центромероспецифичный зонд D13Z1/D21Z1 (зеленый) и субтеломерный зонд 13q (красный).

Кроме того, при проведении aCGH у девочки была обнаружена микроделеция 3q13.31 (рис. 7), затрагивающая регион синдрома микроделеции 3q13.31 (OMIM 615433). По данным ПЦР в реальном времени, данная микроструктурная хромосомная аномалия была унаследована пробандом от здоровой матери, которая, в свою очередь, унаследовала ее от своей матери (рис. 10). В фибробластах ребенка при использовании aCGH также выявлена микроделеция 22q13.32-q13.33. При подтверждении кольцевой хромосомы 22 методом FISH в фибробластах на первом пассаже нами было об-

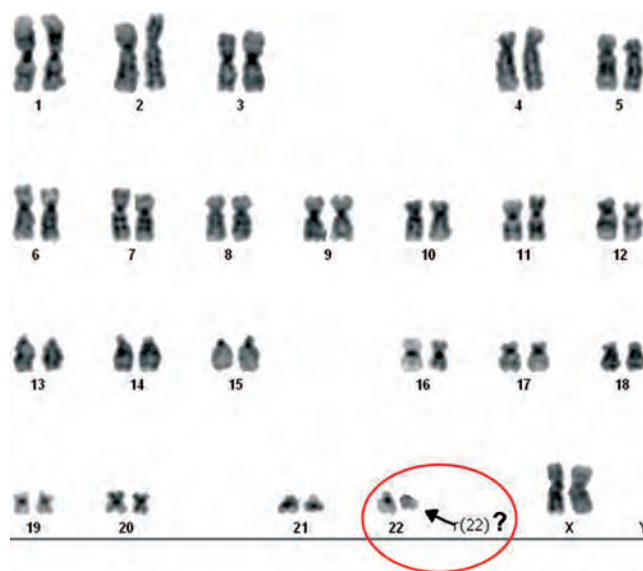


Рис. 6. Кариограмма пациентки 2. Стрелкой отмечена кольцевая хромосома 22.

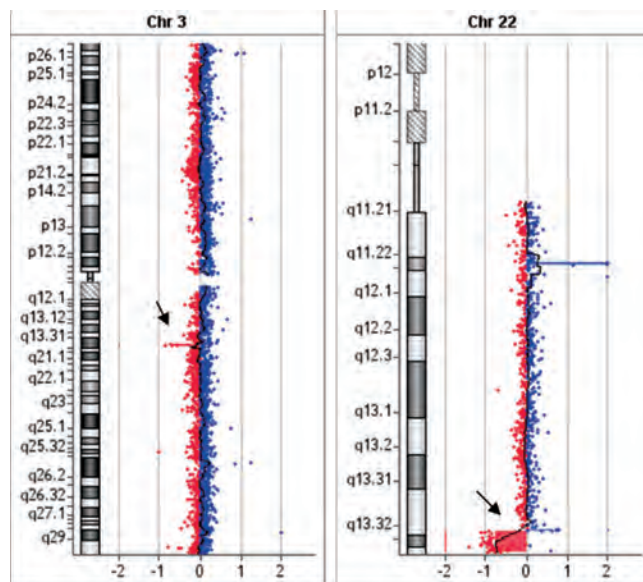


Рис. 7. aCGH профили хромосом 3 и 22 в лимфоцитах пациентки 2. Стрелками отмечены микроделеции 3q13.31 и 22q13.32-q13.33.

наружено, что 24% клеток были моносомными по хромосоме 22 (табл. 3, рис. 11). Далее наблюдалось увеличение числа моносомных клеток с ростом числа пассажей, которое к 33 пассажиру достигло 44%. С использованием критерия  $\chi^2$  показано статистически значимое увеличение уровня моносомных клеток от 5 пассажа к 25 пассажиру ( $\chi^2 = 6,649, p < 0,05$ ). Однако при культиви-

ровании клонов ИПСК, полученных из фибробластов пробанда, доля моносомных клеток была несколько меньше и составила для клона iTAF29 17% на пассаже 7 и 12,5% на пассаже 11; а для клона iTAF32 — 6,3% на пассаже 9. Уменьшение уровня моносомных клеток для iTAF29 с P7 до P11 не являлось статистически значимым ( $\chi^2 = 0,437, p > 0,05$ ).

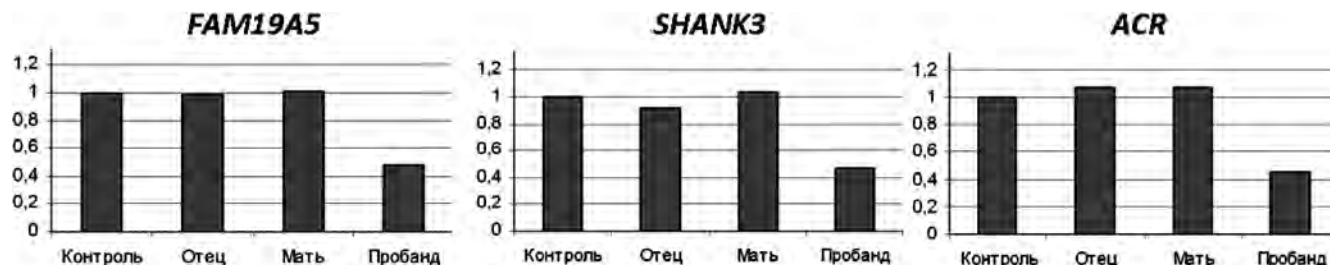


Рис. 8. Результаты ПЦР в реальном времени для семьи пациентки 2 с праймерами на гены *FAM19A5*, *SHANK3*, *ACR* (del22q13.32-q13.33).

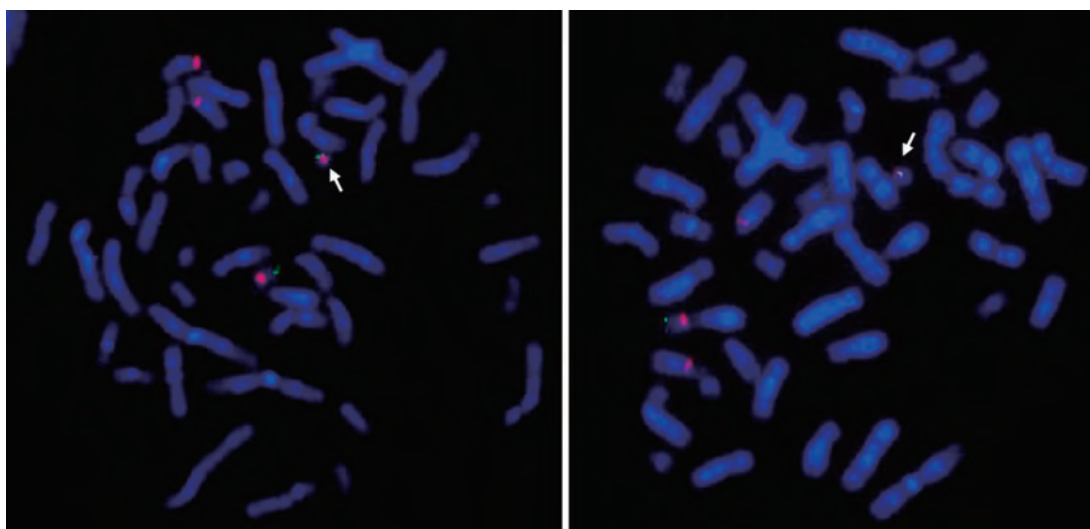


Рис. 9. FISH-анализ для лимфоцитов пациентки 2. Кольцевая хромосома 22 отмечена стрелкой. Использованы центромероспецифичный зонд D14Z1/D22Z1 (красный) и зонд на ген *TBC1D22A* (зеленый).

Результаты интерфазного FISH-анализа лимфоцитов, фибробластов кожи и ИПСК пациента 2 с кольцевой хромосомой 22

Таблица 3

Тип клеток/продолжительность культивирования или номер пассажа	FISH			
	D14Z1/D22Z1 x 3	D14Z1/D22Z1 x 4	Всего	% клеток с моносомией 22
Лимфоциты/72 ч	41	438	479	8,56
Фибробласты/П1	27	86	113	23,89
Фибробласты/П3	59	237	296	19,93
Фибробласты/П5	56	120	176	31,81
Фибробласты/П15	98	140	238	41,18
Фибробласты/П25	88	110	198	44,44
Фибробласты/П33	84	108	192	43,75
ИПСК29/П7	9	44	53	16,98
ИПСК29/П11	7	49	56	12,50



Важно отметить, что моносомии у представленных пациентов впервые были зарегистрированы только в фибробластах методом FISH и не обнаружены в лимфоцитах при стандартном кариотипировании. Это подчеркивает важность исследования более чем одной ткани в случае, если фенотип пациента невозможно объяснить уже обнаруженными мутациями или ни одной аномалии не было выявлено в лимфоцитах периферической крови. Кроме того, что особенно важно для разработки технологий хромосомной терапии, наличие моносомного клона указывает на нестабильность кольцевой хромосомы уже *in vivo* и дает надежду на эффективную ее коррекцию в ИПСК.

В аналогичной работе Bershteyn с соавторами были получены ИПСК из клеток кожи пациентов с множественными врожденными аномалиями, 80–100% фибробластов которых содержали кольцевую хромосому 13, а в остальных клетках наблюдалось 45 хромосом с потерей кольца или неканоничные aberrации с вовлечением  $r(13)$  [10]. Анализ кариотипа ИПСК на шести пассажах показал, главным образом, наличие кариотипа 46,XY, $r(13)$ ; при этом в части клеток кольцевая хромосома отсутствовала. Шесть из девяти клонов после восьмого пассажа демонстрировали нормальный кариотип. Например, клон 4, содержащий преимущественно клетки с кариотипом 46,XY, $r(13)$  на шестом пассаже, на двенадцатом пассаже имел кариотип 46,XY. Данные результаты, по мнению авторов, представляют динамичный мозаицизм между клонально-родственными клетками, приводя к преимущественному выживанию кариотипически нормальных ИПСК в течение шести пассажей, чего не происходит в фибробластах. FISH-анализ подтвердил нормальный кариотип в клонах ИПСК. SNP-микрочипы показали отсутствие делеций и полную гомозиготность по хромосоме 13. ИПСК с исправленным кариотипом экспрессировали маркеры стволовых клеток и дифференцировались в три зародышевых листка. По мнению авторов, феномен спонтанного восстановления нормального числа хромосом в стволовых клетках можно объяснить тем, что репрограммирование, активируя клеточное деление, повышает возможность случайного нерасхождения хромосом и компенсацию потери кольца. Далее изодисомные клетки имеют преимущество в делении и росте над клетками с кольцевой хромосомой, несущей крупную делецию, что в итоге приводит к появлению клона клеток с нормальным кариотипом.

Разрабатывая и применяя в дальнейшем технологии хромосомной терапии, следует помнить, что полученные клетки с исправленным кариотипом имеют однородительскую дисомию по восстановленной хромосоме, что может приводить к нежелательным клиническим последствиям за счет гомозиготизации рецессивных мутаций или нарушения импринтинга, если хромосома содержит импринтированный регион. Кроме потенциальной возможности использования данных технологий

в целях оказания помощи больному, они могут иметь большое значение и для науки. Методами редактирования генома возможно получение клеточных линий с исправленным кариотипом, изогенных по отношению к мутантным линиям, представляющим собой модель заболевания. Такие линии будут иметь один и тот же генетический фон и отличаться только наличием исследуемой мутации в последних, что позволит выявлять реальные различия, обусловленные aberrацией, на клеточном и молекулярном уровнях. Таким образом, появля-

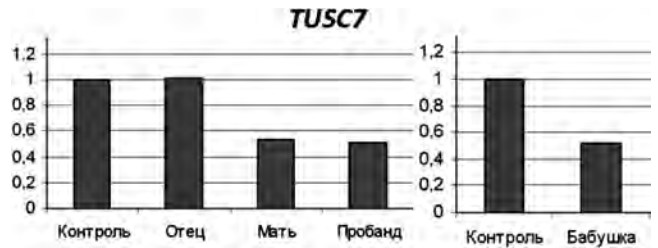


Рис. 10. Результаты ПЦР в реальном времени для семьи пациентки 2 с праймерами на ген *TUSC7* (delq13.31).

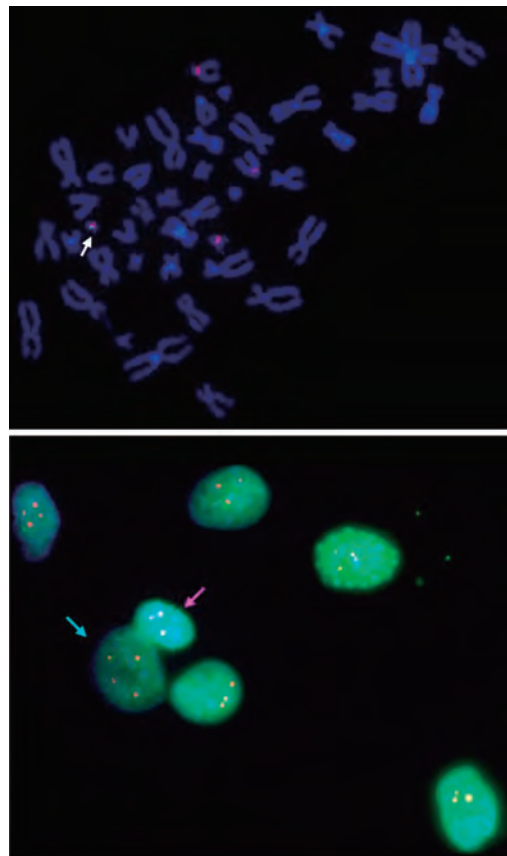


Рис. 11. FISH-анализ для фибробластов кожи пациентки 2. Кольцевая хромосома 22 отмечена белой стрелкой. Голубой и малиновой стрелками отмечены клетка с кольцевой хромосомой 22 и с моносомией 22 соответственно. Использованы центромероспецифичный зонд D14Z1/D22Z1 (красный) и зонд на ген *TBC1D22A* (зеленый).

ется новая возможность для изучения патогенеза заболеваний, обеспечивая потенциальные точки приложения терапевтических подходов в будущем.

Развитие методов замыкания хромосомы в кольцо в культуре клеток открывает новые перспективы для исследования кольцевых хромосом *in vitro*, что в настоящее время невозможно, поскольку подобные хромосомы крайне нестабильны и быстро теряются на ранних этапах культивирования ИПСК. Получение кольцевых хромосом генно-инженерными методами с использованием стабилизирующих или дестабилизирующих факторов позволит обеспечить стабильность колец для последующего анализа их эффектов или индуцировать их потерю для целей терапии.

### Список литературы

1. Khan MA, Khan S, Windpassinger C et al. The Molecular Genetics of Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability: a Mutational Continuum and Future Recommendations. *Ann Hum Genet.* 2016; 80(6):342-368.
2. Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding — genetic basis of intellectual disability. 2016; doi: 10.12688/f1000research.7134.1.
3. Kim T, Bershteyn M, Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy. Correction of large chromosomal aberrations by inducing ringchromosomes in induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Nucleus.* 2014; 5(5):391-395.
4. Plona K, Kim T, Halloran K, Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy: Potential strategies for the correction of severe chromosomal aberrations. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2016; 172(4):422-430.
5. Протокол aCGH для микрочипов Agilent Technologies — [http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3\\_1\\_CGH\\_ULS\\_Protocol.pdf](http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf)
6. База данных геномных вариантов — <http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>
7. Каталог «Менделевское наследование у человека» — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
8. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2007; 2(12):3081-3089.
9. База данных геномных вариантов и фенотипов — <https://decipher.sanger.ac.uk/>
10. Bershteyn M, Hayashi Y, Desachy G et al. Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2014;507(7490):99-103.
11. Кашеварова АА, Лебедев ИН. Траектории интерпретации фенотипа и кариотипа через призму взаимодействия врача-генетика и лабораторного генетика. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. — Вып. 26. — Новосибирск: Академиздат, 2017; 47-55.
12. Izykowska K, Przybylski GK, Gand C et al. Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sezary syndrome. *Oncotarget.* 2017; 8(24):39627-39639.
13. Беляева ЕО, Кашеварова АА, Никонов АМ и др. Значимость молекулярного кариотипирования для уточнения диагноза при цитогенетически визуализируемой хромосомной патологии. *Медицинская генетика.* 2016; 7:17-20.
14. Rocchi M, Archidiacono N, Carbone R et al. Isolation of a human chromosome 22-specific alpha satellite clone. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991; 58:2050-2051.

# Паттерн метилирования ДНК в участках генома с наследуемыми CNV

Скрябин Н.А.<sup>1,2</sup>, Васильев С.А.<sup>1,2</sup>, Толмачева Е.Н.<sup>1,2</sup>, Шорина А.Р.<sup>3</sup>, Савченко Р.Р.<sup>1</sup>, Кашеварова А.А.<sup>1,2</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

<sup>3</sup> Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер, Новосибирск

Роль CNV в патогенезе умственной отсталости и аутизма значительна. Тем не менее, при анализе CNV-ассоциированных заболеваний дискуссионным вопросом остается выделение патогенетически значимых CNV, при этом механизмы фенотипического проявления унаследованных полиморфных вариантов и их неполной пенетрантности остаются во многом неясными. В настоящее время неполная пенетрантность CNV объясняется, в основном, с точки зрения аллельных взаимодействий различных генетических вариантов. При этом эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в контексте структурных вариаций генома остаются практически неизученными. Целью настоящей работы являлся поиск дифференциально метилированных CpG-сайтов, локализованных в регионах с унаследованными CNV, в семьях с умственной отсталостью и аутизмом. В результате проведенной работы идентифицировано дифференциальное метилирование внутригенных CpG-сайтов гена *IMMP2L* в семье больного с умственной отсталостью и микроделецией 7q31.1. Полученные данные указывают на возможность участия метилирования ДНК в реализации механизмов неполной пенетрантности CNV-ассоциированных патологических состояний.

**Ключевые слова:** CNV, метилирование ДНК, умственная отсталость, аутизм.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10229

## DNA methylation pattern in regions of the genome with inherited CNV

Skryabin N.A.<sup>1,2</sup>, Vasiliev S.A.<sup>1,2</sup>, Tolmacheva E.N.<sup>1,2</sup>, Shorina A.R.<sup>3</sup>, Savchenko R.R.<sup>1</sup>, Kashevarova A.A.<sup>1,2</sup>, Lebedev I.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk

<sup>3</sup> Novosibirsk Regional Children's Clinical Psychoneurological Dispensary, Novosibirsk

The role of CNV in pathogenesis of intellectual disability and autism is significant. Nevertheless, in the analysis of CNV-associated diseases, the interpretation of pathogenetically significant CNV remains a debatable issue, while the mechanisms of the phenotypic manifestation of inherited CNVs and their incomplete penetrance remain largely unclear. At present, the incomplete penetrance of CNV is explained mainly from the point of view of allelic interactions of various genetic variants. At the same time, the epigenetic mechanisms of gene expression regulation in the context of structural genome variations remain practically unexplored. The purpose of this study was to search for differentially methylated CpG sites located in regions with inherited CNV in families with mental retardation and autism. As a result, differential methylation of intragenic CpG sites of the *IMMP2L* gene in the family of a patient with intellectual disability and 7q31.1 microdeletion was identified. The data obtained indicate the possibility of the involvement of DNA methylation in the regulatory mechanisms of incomplete penetration of CNV-associated diseases.

**Keywords:** CNV, DNA methylation, mental retardation, autism.

### Актуальность

Геном человека характеризуется высокой вариабельностью по копияности отдельных регионов (copy number variation, CNV), размеры которых варьируют от нескольких десятков до миллиона пар оснований. Около 90% регионов CNV перекрываются с известными генами, что указывает на их возможную роль в регуляции экспрессии через эффект дозы или положения гена. Точное число наследственных заболеваний, обусловленных CNV, остается неизвестным, однако очевидно,

что их количество может быть очень значительным. Показано, что CNV лежат в основе 14–18% случаев умственной отсталости (УО) неясной этиологии [1]. Другой частой нозологией, ассоциированной с CNV, является аутизм — от 6% до 10% случаев аутизма и расстройств аутистического спектра (РАС) ассоциированы с CNV [2].

Учитывая значительное количество CNV в геноме здоровых индивидов, важной проблемой является оценка потенциальной патогенетической значимости различных CNV. Возможно, данные перестройки могут

проявляться фенотипически, но с низким уровнем пенетрантности. Однако практически нет данных, объясняющих неполную пенетрантность унаследованных структурных вариаций генома, которая может лежать в основе недостаточной оценки патогенетически значимых CNV. Это приводит к сложностям в выявлении хромосомных перестроек и кандидатных генов у больных, а также к неопределенности прогноза наследования таких нарушений и повышению риска возникновения различных CNV-ассоциированных заболеваний в потомстве носителей полиморфных вариантов.

В настоящее время неполная пенетрантность CNV объясняется, в основном, с точки зрения аллельных взаимодействий различных генетических вариаций [3, 4]. В частности, рассматриваются варианты взаимодействия «CNV-CNV», «CNV-анеуплоидия» и «CNV-точковые мутации». При этом варианты взаимодействия CNV с эпигенетическими модификациями генома рассматриваются лишь в отдельных случаях, в основном, в контексте импринтированных локусов генома [5]. *Целью настоящего исследования* явился поиск дифференциально метилированных CpG-сайтов, локализованных в регионах с унаследованными CNV, в семьях с УО и аутизмом.

#### Материалы и методы

Проанализировано 42 образца ДНК из 13 семей (13 пробандов, 5 sibсов, 11 отцов и 13 матерей). Исследование было выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также с использованием образцов ДНК из биобанка «Биобанк населения Северной Евразии». Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Детекция несбалансированных микроструктурных хромосомных перестроек была проведена с использованием микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray 8 x 60K (Agilent Technologies, США). Методом количественной ПЦР были подтверждены все идентифицированные CNV и установлено их родительское происхождение.

Для анализа статуса метилирования ДНК было использовано бисульфитное секвенирование ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) [5]. Метод основан на ПЦР амплификации бисульфит-конвертированной ДНК с последующим секвенированием методом NGS. После бисульфитной конвертации ДНК была проведена амплификация участков 300–800 п.н. в промоторных регионах выбранных генов и во внутригенных CpG-сайтах путём ПЦР. Присоединение адаптеров и индексов осуществлялось с использованием набора Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводилось на сек-

венаторе MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina, США). Для цитозина в составе CpG-пар оценивался индекс метилирования (отношение числа ридов с C/T).

#### Результаты и обсуждение

В лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, начиная с 2012 года проводятся работы по поиску микроструктурных хромосомных аномалий при различных нозологиях, в частности при недифференцированной УО, аутизме и РАС. Для настоящего исследования из накопленной базы данных были отобраны 13 семей больных с УО и аутизмом, в которых были идентифицированы унаследованные патогенетически значимые CNV или унаследованные CNV с неизвестной патогенетической значимостью, не являющиеся полиморфными вариантами. Всего было выделено девять микроструктурных хромосомных перестроек, удовлетворяющих указанным требованиям — 5 дупликаций (3p26.3, 5q33.1, 12q24.12, 17p13.3, 18p11.32) и 4 делеции (7q31.1, 9p21, 12p11.1, 17q12). Три хромосомные аберрации повторялись в двух независимых родословных — делеции 7q31.1 и 17q12 и дупликация 12q24.12. Все идентифицированные CNV были подтверждены методом ПЦР в реальном времени, также этим методом были установлены их наследование и происхождение. У всех родителей, являющихся носителями CNV, клиническая картина не проявлялась.

В выявленных регионах с CNV были отобраны гены, изменение экспрессии которых могло привести к развитию клинической картины у пробандов. Основным критерием отбора генов являлась функция гена, т.е. были отобраны гены, продукты которых участвуют в функционировании нервной системы. Также учитывалось наличие CpG-островков в промоторных регионах генов и/или внутригенных CpG-сайтов. Отобранные гены отображены в таблице.

В результате анализа промоторных областей генов *SYT10*, *LINGO2* и *ASTN1* дифференциального метилирования CpG-сайтов не было выявлено. Уровень метилирования исследованных CpG-сайтов в промоторных областях был очень низким (0–10%). В промоторах генов *ACAD10*, *NDC80*, и *SLFN11*, напротив, был выявлен очень высокий уровень метилирования — 80–100%.

Дифференциальное метилирование было выявлено при анализе профилей метилирования CpG-сайтов в первом экзоне, а также в первом, третьем, четвертом и пятом интронах гена *IMMP2L* в семье № 9. В литературе также описаны CNV, затрагивающие ген *IMMP2L*, при этом все они являются унаследованными, преимущественно от отцов, которые были как клинически здоровыми, так и с различными неврологическими расстройствами [6, 7]. При сравнении профилей метилирования в образцах ДНК родителей, пробанда и здорового sibса было показано, что паттерны метилирования детей и от-

Исследованные микроструктурные хромосомные перестройки и гены, в них локализованные

№ семей	CNV	Размер CNV, т.п.н.	Происхождение	Гены	Число изученных CpG-сайтов
1	dup18p11.32	432	Отцовское	<i>SMCHD1</i>	36
				<i>NDC80</i>	5
2	dup12q24.12	125	Материнское	<i>ACAD10</i>	14
3	dup12q24.12	125	Материнское	<i>ACAD10</i>	14
4	dup5q33.1	115	Материнское	<i>GRPEL2</i>	1
5	del1q25.2	6140	Материнское	<i>ASTN1</i>	72
6	dup3p26.3	832	Отцовское	<i>CNTN6</i>	18
7	dup17p13.3	733	Материнское	<i>GEMIN4</i>	14
8	del12p11.1	517	Материнское	<i>SYT10</i>	65
9	del7q31.1	114	Материнское	<i>IMMP2L</i>	87
10	del7q31.1	44	Материнское	<i>IMMP2L</i>	87
11	del17q12	51	Отцовское	<i>SLFN11</i>	15
12	del17q12	51	Материнское	<i>SLFN11</i>	15
13	del9p21.1	112	Материнское	<i>LINGO2</i>	25

ца схожи, в то время как паттерн метилирования матери отличается от остальных членов семьи (рис. 1). Было выявлено, что у матери наблюдается гипометилирование CpG-сайтов в интронах гена *IMMP2L* по сравнению с детьми (рис. 2). CpG-сайты, локализованные в первом экзоне, во всех случаях были не метилированы. Однако в интронах наблюдался более низкий уровень метилирования у матери по отношению к обоим детям, в частности по 17 CpG-сайтам разница в уровне метилирования составляла более 10%. Тот факт, что профиль метилирования детей и отца был примерно одинаковым, свидетельствует в пользу того, что гипометилирование у матери не является возрастзависимым эффектом.

В семье № 10 также была выявлена небольшая внутригенная делеция в гене *IMMP2L* у двух детей и

у здоровой матери. В результате кластерного анализа было показано, что профили метилирования детей и отца схожи, в то время как профиль метилирования матери отличается от остальных членов семьи (рис. 3). В отличие от семьи № 9, в семье № 10 паттерн метилирования детей оказался более сходным (рис. 4). Возможно, это является отражением того, что в данном случае оба ребенка являются больными. Гипометилирование у матери наблюдалось по меньшему числу сайтов, чем в семье № 9 — в девяти гипометилированных CpG-сайтах разница уровня метилирования составляла более 10%.

На настоящий момент роль метилирования внутригенных CpG-сайтов в регуляции экспрессии генов изучена мало. Было показано что в генах со средним

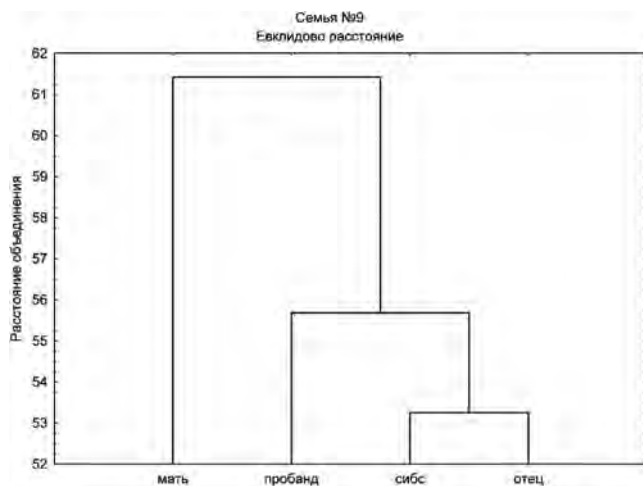


Рис. 1. Кластерный анализ профиля метилирования в гене *IMMP2L* у членов семьи № 9.

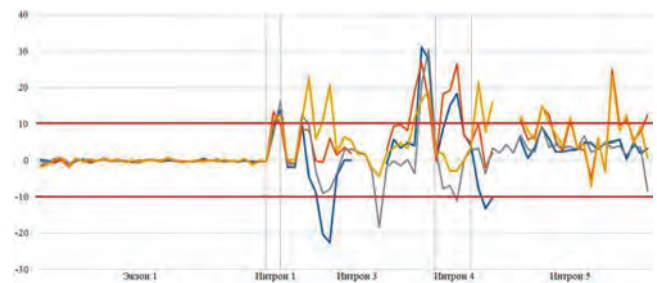


Рис. 2. Отношение индексов метилирования CpG-сайтов в гене *IMMP2L* между детьми и родителями семье № 9. Синим цветом обозначены значения отношения профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов отца; оранжевый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов отца; серый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов матери; желтый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов матери.

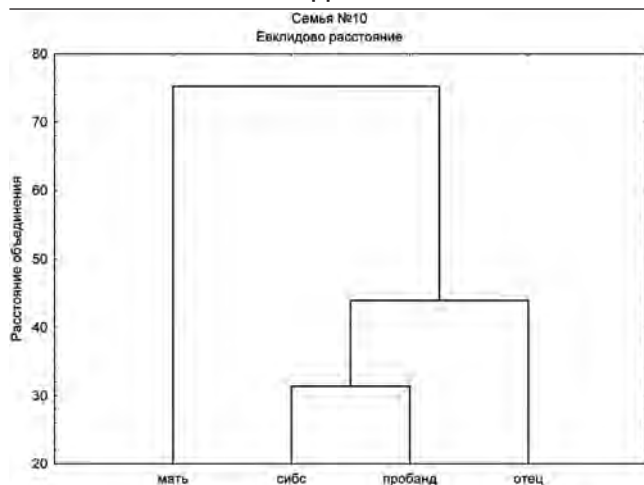


Рис. 3. Кластерный анализ профиля метилирования в гене *IMP2L* у членов семьи № 10.

уровнем экспрессии наблюдается прямая корреляция уровня метилирования этих областей и экспрессии, тогда как в низко- и высокоэкспрессирующихся генах корреляция обратная [8]. В семьях № 9 и № 10 есть вероятность того, что гипометилирование внутригенных CpG-сайтов гена *IMP2L* у матерей, носителей делеции, приводит к повышению уровня экспрессии гена и соответственно к компенсации количества белкового продукта.

### Заключение

В настоящей работе было идентифицировано дифференциальное метилирование ДНК в субсегменте 7q31.1 с делециями в гене *IMP2L* между здоровыми матерями, носителями делеции, и остальными членами семей. Данная находка указывает на возможность участия эпигенетических модификаций генома в реализации механизмов неполной пенетрантности унаследованных CNV.

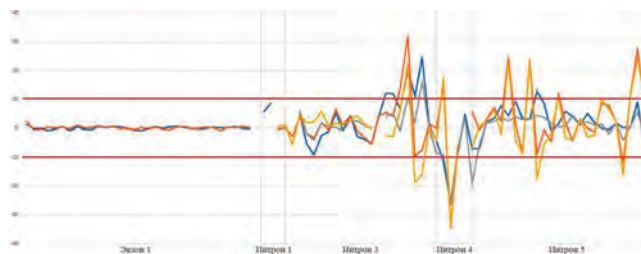


Рис. 4. Отношение индексов метилирования CpG-сайтов в гене *IMP2L* между детьми и родителями семье № 10. Синим цветом обозначены значения отношения профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов отца; серый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов отца; оранжевый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов пробанда к профилю метилирования CpG-сайтов матери; желтый — отношение профиля метилирования CpG-сайтов сибса к профилю метилирования CpG-сайтов матери.

### Список литературы

1. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JAS et al. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: Lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):174-202.
2. Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. *Behav Brain Res.* 2013; 251:95-112.
3. Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet.* 2007;8(8):639-46.
4. Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12(March):e8.
5. Smith AC, Suzuki M, Thompson R, et al. Maternal gametic transmission of translocations or inversions of human chromosome 11p15.5 results in regional DNA hypermethylation and downregulation of *CDKN1C* expression. *Genomics.* 2012;99(1):25-35.
6. Gimelli S, Capra V, Di Rocco M, et al. Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting *IMP2L* gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Mol Cytogenet.* 2014;7:54.
7. Bertelsen B, Melchior L, Jensen LR et al. Intragenic deletions affecting two alternative transcripts of the *IMP2L* gene in patients with Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(11):1283-1289.
8. Jjingo D, Conley AB, Yi SV et al. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget.* 2012;3(4):462-474.

# Генофонд коренных народов Дагестана андийской группы по ауtosомным STR-маркерам

Харьков В.Н.<sup>1,2</sup>, Колесников Н.А.<sup>1</sup>, Раджабов М.О.<sup>3</sup>, Хитринская И.Ю.<sup>1</sup>, Степанов В.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, vladimir.kharkov@medgenetics.ru

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

<sup>3</sup> ФГБН «Институт физики им. Х.И. Амирханова» ДНЦ РАН

Охарактеризована структура генофонда коренного населения Дагестана, принадлежащего к андийской группе народов нахско-дагестанской языковой семьи, по ауtosомным STR-маркерам. Исследованы популяции представляющие андийцев, ахвахцев, багулалов, ботлихцев, годоберинцев, каратинцев, тиндинцев и чамалинцев. Все пары сравниваемых выборок демонстрируют отсутствие статистически значимых различий между разными этносами по частотам аллелей STR. Основными чертами генофонда исследованных народов Дагестана являются относительно высокое генетическое разнообразие и низкий уровень генетической дифференциации между этносами.

**Ключевые слова:** генофонд, популяция, генетическое разнообразие, народы Дагестана.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 16-34-60222 мол\_а\_дк и программы поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

## Gene pool of the Andi populations of Dagestan from the data of STR markers

Kharkov V.N.<sup>1,2</sup>, Kolesnikov N.A.<sup>2</sup>, Radzhabov M.O.<sup>3</sup>, Khitrinskaya I.Y.<sup>1</sup>, Stepanov V.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> Daghestan Institute of Physics after Amir Khanov, Makhachkala, Russia

\* Corresponding author: vladimir.kharkov@medgenetics.ru (Vladimir Kharkov)

The structure of the gene pool of the indigenous population of Dagestan belonging to Andi language group of Nakh-Dagestani language family using STR markers was investigated. We used DNA population samples representing Andi, Akhvah, Bagulal, Botlikh, Godoberi, Karata, Tindi and Chamalals. All of the pairs of the compared samples demonstrated no statistically significant differences between the different population. The main features of the gene pool of the peoples of Dagestan are relatively high genetic diversity and a low level of genetic differentiation between ethnic groups.

**Keywords:** gene pool, population, genetic diversity, Dagestan.

### Введение

Республика Дагестан — уникальный район не только России, но и всего мира с точки зрения разнообразия естественно-географических условий, этнокультурного многообразия проживающего здесь населения и историко-генетических проблем. Дагестан является самой многонациональной республикой России. Здесь в течение тысячелетий формировались и развивались десятки народов. В настоящее время в республике насчитывается 26 коренных народностей, говорящих на различных языках кавказской, алтайской и индоевропейской языковых семей [1]. При этом языки народов Дагестана высоко дифференцированы, что является свидетельством постоянной лингвистической эволюции в регионе [2]. Кроме дифференцировки языков непрерывно шёл процесс изоляции, действие которой усиливалось большим числом эндогамных браков внутри поселений.

Народы Дагестана в антропологическом отношении почти все относятся к переднеазиатской или балка-

но-кавказской ветви европеоидной расы с подразделением на два типа: кавкасионский (относительно светлая пигментация, массивный лицевой скелет, высокий рост), к которому относятся аварцы, андийцы, дидойцы, лакцы, даргинцы, и каспийский (более грацильный, узколицый и темноволосый) — лезгины, табасараны, рутульцы, агулы, цахуры, кумыки, кайтаги [1].

В последние годы вышли в свет работы по изучению структуры генофондов крупных коренных этносов Дагестана таких, как аварцы, даргинцы, кумыки, лезгины [3–6]. В то же время остаются практически неизученными малочисленные коренные народы Дагестана, населяющие западные и юго-западные районы Республики. Их изучение представляет несомненный интерес как с точки зрения описания новых этнических групп, так и более полной характеристики всего северокавказского генофонда. В частности, интерес представляет андийская группа народов (андийцы, ахвахцы, багулалы, ботлихцы, годоберинцы, каратинцы, тиндинцы, чамалин-

цы), представители которой расселены в юго-западной горной части Дагестана. Приблизительная численность народов (по оценке, поскольку они не учитывались в переписи) андийской группы составляет около 35 тыс. чел. Андийские языки наиболее близки аварскому языку. По данным глоттохронологии, разделение аваро-андийской общности относится к середине 2-го тысячелетия до н.э., а распад андийской общности — к середине 1-го тысячелетия до н.э. (в научной литературе встречаются и другие хронологические оценки, например, распад аваро-андийского единства относят к началу н.э., а разделение андийской общности — к VIII в. н.э.) [1]. Целью настоящей работы была характеристика структуры генофондов коренных народов Дагестана, принадлежащих к андийской группе нахско-дагестанской языковой семье по 20 аутосомным STR-маркерам.

### Материалы и методы

Материал исследования составили образцы ДНК неродственных между собой мужчин из различных локальных популяций ( $N = 466$ ). Забор первичного биологического материала (венозной крови) у доноров производили на основании письменного информированного согласия на проведение исследования. Сбор образцов осуществлялся из локтевой вены в пластиковые вакуумные пробирки с ЭДТА. На каждого донора составлялась анкета с краткой родословной, указанием национальности и мест рождения предков.

Большая часть материала была собрана в ходе экспедиций, организованных к.б.н. М.О. Раджабовым и НИИ медицинской генетики и проводившихся во взаимодействии с представителями региональных органов здравоохранения в 2011–2015 годах.

Выборка андийцев ( $N = 105$ ) представляет население сел Анди ( $N = 50$ ), Риквани ( $N = 10$ ), а также сел Гагатли ( $N = 21$ ) и Муни ( $N = 24$ ) Ботлихского района.

Популяционная выборка ахвахцев ( $N = 31$ ) сформирована из числа жителей следующих населенных пунктов: села Тад-Магитль ( $N = 15$ ) и села Кудиябросо ( $N = 16$ ) Ахвахского района.

Выборка багулалов ( $N = 25$ ) составлена из числа жителей села Тлибишо ( $N = 20$ ) и села Агвали ( $N = 5$ ) Ахвахского и Цумадинского районов соответственно.

Ботлихцы ( $N = 66$ ) представлены популяционной выборкой, сформированной из числа жителей двух населенных пунктов: села Миарсо ( $N = 14$ ) и села Ботлих ( $N = 52$ ) Ботлихского района Дагестана.

Выборка годоберинцев ( $N = 31$ ) представлена жителями села Годобери Ботлихского района.

Выборка каратинцев ( $N = 55$ ) представляет три населенных пункта: село Карата ( $N = 41$ ), село Маштада ( $N = 7$ ) и село Арчо ( $N = 7$ ) Ахварского района.

Выборка тиндинцев ( $N = 66$ ) сформирована из числа жителей двух населенных пунктов: села Тинди ( $N = 45$ ) и села Тисси-Ахитли ( $N = 21$ ) Цумадинского района.

Выборка чамалинцев ( $N = 67$ ) представлена жителями села Гигатле ( $N = 24$ ), села Агвали ( $N = 15$ ) и селения Нижнего и Верхнего Гаквари ( $N = 28$ ) Цумадинского района.

Для изучения состава и структуры генофонда исследуемых народов в рамках данной работы использовались 20 аутосомных STR-маркеров: D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, PentaD, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D22S1045, D3S1358, D1S1656, D2S441, D13S317, PentaE, TH01, vWA, D7S820, D7S818, TPOX. Использовался набор PowerPlex® Fusion System (Promega).

STR-маркеры генотипировали методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3730 в присутствии стандартов длины молекул ДНК Internal Lane Standard 500 (Promega) с использованием программного обеспечения GeneMapper. Соответствие размеров фрагментов ДНК исследуемых локусов количеству составляющих их tandemных повторов подтверждено использованием при каждом запуске прибора специального аллельного леддера PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix, маркирующего все аллели по каждому из исследованных STR-маркеров. Аллели обозначали по количеству tandemных повторов в соответствующем STR. Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Оценку генетического разнообразия в исследуемых популяциях производили по формуле Нея [7]. Генетическую дифференциацию оценивали путём анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) [8]. Использовали коэффициент  $F_{st}$ , проводя 10000 пермутаций исходного массива данных. Статистическую значимость межпопуляционных различий оценивали с использованием точного теста популяционной дифференциации (уровень значимости = 0,05). Матрицы попарных дистанций ( $F_{st}$  по Слаткину) рассчитывали, используя 1000 пермутаций исходного массива данных. Расчеты проводили в программном пакете ARLEQUIN 3.5.1.2. [9].

Генетические взаимоотношения между популяциями выявляли методом многомерного шкалирования. Анализ и построение графиков проводили с использованием пакета программ STATISTICA 7.0. Соответствие наблюдаемого распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга оценивали с использованием точного теста по Гуо и Томпсону [10], реализованного в пакетах ARLEQUIN 3.5.1.2 [9].

### Результаты и обсуждение

Проведенный анализ распределения частот аллелей выбранных STR-маркеров в выборках из Дагестана выявил высокий средний уровень генетического разнообразия и небольшую неоднородность изученных популяций по степени генетического разнообразия их мужского генофонда (таблица). Наиболее разнообразным в андийской группе оказался генофонд чамалинцев ( $H = 0,801$ ).



Генетическое разнообразие исследованных этносов

Этнос	H
Андийцы	0,774
Ахвахцы	0,723
Багуалалы	0,745
Ботлихцы	0,770
Годоберинцы	0,784
Каратинцы	0,774
Тиндинцы	0,749
Чамалинцы	0,801

Наименьшим генетическим разнообразием обладают ахвахцы ( $H = 0,723$ ) и багуалалы ( $H = 0,745$ ). Ранее было показано, что популяции родственной андийской цезской группы народов, населяющие горные районы юго-западного Дагестана характеризуются значительно более низким уровнем генетического разнообразия по гаплогруппам Y-хромосомы, по сравнению с другими северокавказскими популяциями [11].

Данные о частотах аллелей STR-маркеров в исследованных популяционных выборках были использованы для выяснения филогенетических взаимоотношений между изучаемыми этносами. Результаты многомерного шкалирования показывают, что исследованные популяции не образуют между собой тесных групп, при этом тиндинцы, годоберинцы и ботлихцы отделены по первому измерению от каратинцев, чамалинцев и багуалалов (рисунок). Ахвахцы и андийцы занимают промежуточное положение

между ними. В целом, такое взаимное расположение популяций практически полностью соответствует географическому расположению населенных пунктов, в которых были собраны соответствующие выборки. Так, тиндинцы, годоберинцы и ботлихцы проживают в населенных пунктах в самой западной части Дагестана на границе с Чеченской республикой. Села, где проживают агуалалы и каратинцы находятся восточнее, а андийцы проживают севернее и почти равно удалены от тех и других. Таким образом, генетические расстояния между этносами андийской группы по аутосомным STR-маркерам хорошо согласуются с географическими расстояниями. Это вполне соответствует общей тенденции по наличию значимых корреляций между генетическими и географическими дистанциями, выявляемой на различных маркерных системах. Исключением их этого правила являются чамалинцы, географически наиболее близкие тиндинцам.

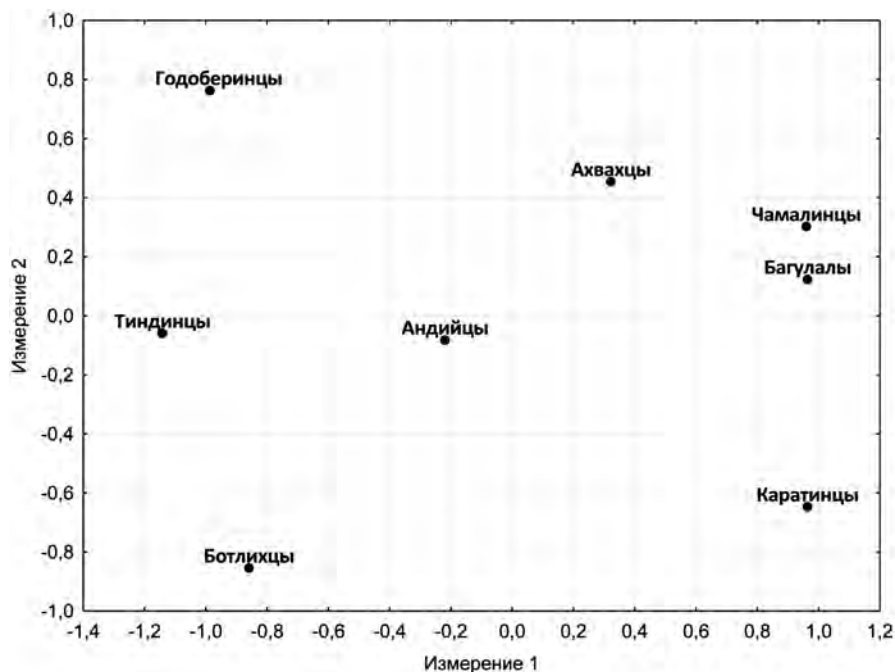


График многомерного шкалирования матриц генетических расстояний ( $F_{st}$ -статистики Slatkina) исследованных этносов Дагестана.

Точный тест популяционной дифференциации показывает отсутствие статистически значимых различий по частотам STR между всеми парами популяций. При этом, практически для всех локусов в большинстве популяций наблюдается соответствие наблюдаемого распределения генотипов равновесию Харди—Вайнберга, оцененное с использованием точного теста по Гуо и Томпсону [10] в пакетах ARLEQUIN 3.5.1.2 [9]. Межпопуляционная дифференциация в андийской группе оказалась относительно низкой, Fst по AMOVA составляет 1,76 %. То есть, несмотря на высокий уровень инбридинга и изоляции различных этносов, за счет культурных и географических барьеров, результаты дисперсионного анализа свидетельствуют о значительной генетической близости этносов андийской группы по аутосомным STR.

По данным литературы, показатель генетической дифференциации Gst по частотам 12 Alu инсерций в популяциях Дагестана составляет 4%, что значительно выше, чем в популяциях Европы (Gst = 2%), а также Сибири и Средней Азии, где доля межпопуляционных различий коренных этносов Сибири и Средней Азии в общем уровне генетического разнообразия не превышает 1,5% для Alu-инсерций и 3% для STR-маркеров. Высокий показатель Gst в Дагестане обусловлен дифференциацией равнинных и горных жителей Дагестана [5].

Таким образом, совокупность данных по аутосомным STR-маркерам в популяциях андийской группы выявила высокий средний уровень генетического разнообразия и относительно небольшой генетической дифференциации. Показана общность современного генофонда населения андийских этносов и связь генетических расстояний между популяциями с их географической локализацией.

### Список литературы

1. Народы Дагестана. М.: Наука, 2002. Серия «Народы и культуры» / Отв. ред. С. А. Арутюнов, А. И. Османов, Г. А. Сергеева.
2. Nichols J. 2003. The Nakh-Daghestanian consonant correspondences. In: Holisky D, Tuite K, editors. Current trends in Caucasian, East European, and Inner Asian linguistics: papers in honor of Howard I. Aronson. Philadelphia: John Benjamins. p 207-251.
3. Bulayeva K.B., Jorde L., Watkins S., Ostler C., Pavlova T.A., Bulayev O.A., Tofanelli S., Paoli G., Harpending H. Ethnogenomic diversity of Caucasus, Daghestan. // *Am J Hum Biol.* 2006. — Vol. 18(5). — p. 610-620.
4. Кутуев И.А. Генетическая структура и молекулярная филогеография народов Кавказа. Автореферат дисс. на соискание ученой степени доктора биологических наук. Уфа, 2010. 46 с.
5. Юнусбаев Б. Б. Популяционно-генетическое исследование народов — Дагестана по данным о полиморфизме Y-хромосомы и Alu-инсерций. // Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. 2006. — Т. — С. 24.
6. Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., et al. Parallel Evolution of Genes and Languages in the Caucasus Region // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V.28. P. 2905-2920.
7. Nei M. *Molecular evolutionary genetics* / New York: Columbia Univ. Press. 1987.
8. Excoffier L., Smouse P., Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics.* 1992. V. 131. P. 479-491.
9. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. // *Evolutionary Bioinformatics Online.* 2005. V. 1. P. 47-50.
10. Guo S. *Biometrics.* // S. Guo E. Thompson. 1992. V. 48. P. 361-372.
11. Глазунова Е.О., Харьков В.Н., Раджабов М.О., Хитринская И.Ю., Степанов В.А. Генофонд коренных народов Дагестана цезской группы по маркерам Y-хромосомы. // *Медицинская генетика.* 2016. Т. 15. № 4. С. 29-31.

# Анализ родоплеменной структуры хакасов по маркерам Y-хромосомы

Харьков В.Н.<sup>1,2</sup>, Новикова Л.М.<sup>2</sup>, Штыгашева О.В.<sup>3</sup>, Агеева Е.С.<sup>3</sup>,  
Волков В.Г.<sup>2</sup>, Хитринская И.Ю.<sup>1</sup>, Степанов В.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, vladimir.kharkov@medgenetics.ru

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», г. Абакан

Проведен анализ структуры генофонда хакасских родов (сеоков) по маркерам Y-хромосомы. Результаты анализа частот гаплогрупп и YSTR-гаплотипов свидетельствуют, что хакасские сеоки являются родственными объединениями, в большинстве случаев имеющими одного родоначальника по мужской линии. Показано, что мужская часть генофонда хакасов структурирована, прежде всего, по родовому принципу. Для подавляющего большинства образцов установлена тесная генетическая близость представителей одного сеока.

**Ключевые слова:** Y-хромосома, генофонд, популяция, генетическое разнообразие, хакасы, сеок, род.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (РГНФ) № 16-31-01104/16 и программы поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

## Analysis of the tribal structure of Khakass from Y-chromosome markers

Kharkov V.N.<sup>1,2</sup>, Novikova L.M.<sup>2</sup>, Shtygasheva O.V.<sup>3</sup>,  
Ageeva E.S.<sup>3</sup>, Volkov V.G.<sup>2</sup>, Khitrinskaya I.Y.<sup>1</sup>, Stepanov V.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> Khakass State University, Abakan, Russia

\* Corresponding author: vladimir.kharkov@medgenetics.ru (Vladimir Kharkov)

Genetic structure of Khakass genera (seoks) using Y-chromosome markers was investigated. The results of the analyses of haplogroup frequencies and YSTR- haplotypes indicate that Khakass seoks are related associations, in most cases having the same ancestor in the patrilineage. The gene pool of Khakass, more precisely a part marked by Y-chromosome haplogroups, was shown to be primarily structured on a generic principle. A strong genetic affinity of the seok members was shown for the vast majority of the samples.

**Keywords:** Y-chromosome, gene pool, population, genetic diversity, Khakass, seok.

### Введение

Изучение генетического разнообразия популяций человека по-прежнему является одним из ключевых направлений популяционной генетики. Анализ структуры генофондов популяций человека с использованием диаллельных и микросателлитных маркеров Y-хромосомы является одним из наиболее современных и результативных методов изучения генетического разнообразия популяций человека, позволяет проводить комплексную оценку генофонда человечества в целом, отдельных этносов, выполнять филогенетические реконструкции отдельных линий, филогеографические исследования гаплогрупп, миграционных процессов и ряд других задач. Несмотря на бурное развитие методов, позволяющих анализировать генофонды популяций на уровне полных геномов, использование маркеров Y-хромосомы по-прежнему является актуальным для решения целого ряда вопросов популяционной генетики. Особенностью этнического состава большин-

ства южносибирских народов является наличие родов (сеоков), где счет родства ведется по мужской линии. Такая родовая структура характерна для шорцев, хакасов, северных и южных алтайцев, телеутов. Ранее каждый член рода мог назвать до семи поколений своих предков по мужской линии, но в настоящее время эта традиция уходит в прошлое [1]. Это приводит нас к необходимости рассмотрения организации генофонда коренного народонаселения Южной Сибири помимо этнического и субэтнического уровня также и на уровне родов. Современные методы, применяемые в молекулярно-генетических исследованиях, позволяют проверить, является ли сеок кровнородственным объединением, имеющим одного родоначальника по мужской линии, или осознание такой общности является лишь условностью, и сеок является общностью людей, проживающих на одной территории, но не связанных генетическим родством по отцовским генеалогическим линиям.

Хакасы — тюркоязычный народ, живущий в настоящее время в Южной Сибири на левобережье Хакасско-Минусинской котловины, на территории республик Хакасия и Тува, а также на юге Красноярского края. Хакасы подразделяются на четыре этнографические группы: сагайцы, качинцы, кызыльцы, койбалы и более сотни сеоков [1]. Установление родовой принадлежности у хакасов, в большинстве случаев, можно сделать по фамилиям, так как практически все хакасские фамилии приписаны этнографами к конкретному сеоку [2]. Даже если современные жители не относят себя к тому или иному роду, не помнят принадлежности своих предков к конкретному сеоку, более того в настоящее время осознают себя сагайцами, хотя многие поколения их прауродителей считали себя бельтирами или бирюсинцами, фамилия человека служит указателем на его происхождение. Особенностью хакасской родовой системы является почти полное отсутствие однофамильцев. Чаще всего они являются родственниками. Это связано с разнообразием используемых хакасами имен, от которых и произошли хакасские фамилии. Родоначальники этих фамилий жили в основном в XVIII веке. Каждая такая фамилия входит в состав сеока: харга, хасха, пилтир, хый, хобый, хыргыс и т.д. [2].

*Цель исследования* — путём анализа генетической структуры по маркерам Y-хромосомы выяснить, являются ли хакасские сеоки кровнородственными объединениями, имеющими одного родоначальника по мужской линии.

### Материалы и методы

Материал исследования составили образцы ДНК неродственных между собой мужчин из различных локальных популяций (N = 292). Забор первичного биологического материала (венозной крови) у доноров производили на основании письменного информированного согласия на проведение исследования. Сбор образцов осуществлялся из локтевой вены в пластиковые вакуумные пробирки с ЭДТА. На каждого донора составлялась анкета с краткой родословной, указанием этнической принадлежности и мест рождения предков. ДНК для генотипирования выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из лейкоцитов периферической венозной крови стандартным методом.

В исследование включены только образцы ДНК доноров-мужчин, по результатам анкетирования отрицавших факт метисации по отцовской линии с представителями других этносов минимум в трех поколениях. Индивида относили к данной этнической группе на основании его собственной этнической идентификации, этнической идентификации его родителей, места рождения и принадлежности к определенному сеоку. Выборка мужчин хакасов представляет собой коренное население Республики Хакасия. Обследованы три популяционных группы жителей территориально разобщённых районов:

Аскизского (села Усть-Есь, Есино (улус Полтаков), Усть-Чуль и Кызлас, N = 160), Таштыпского (деревни Матур, Анчуль, Большая Сея и Бутрахты, N = 81) и Ширинского (сёла Малый Спириин и Топанов, N = 51). Материал получен в ходе совместных научно-практических медицинских экспедиций в 2007—2008 и 2016 годах. В обследованной выборке оказались представлены следующие сеоки (в алфавитном порядке): кичин, пилтыр, пурут, сагай, сайын, сарыг, сойыт, сор, соххы, табан, таяс, таяш, тиилек, том, том-сагай, туран, халар, хан, харга, хасха, хахпына, хобый, хызыл хая, хый, хыргыс, чити пуур, чыстар, ызыр.

Для изучения состава и структуры гаплогрупп Y-хромосомы в исследование были включены две системы генетических маркеров: диаллельные локусы, представленные SNP, и полиаллельные высоковариабельные микросателлиты (YSTR). С использованием 85 SNP-маркеров определяли принадлежность образцов к той или иной гаплогруппе. Классификация гаплогрупп дана в соответствии с предложенной Консорциумом по исследованию Y-хромосомы [3], с последующими изменениями [4, 5]. На основании данных о составе гаплотипов внутри гаплогрупп выявляли их внутреннее разнообразие и детальные филогенетические взаимоотношения. Генотипирование SNP-маркеров проводили методом ПЦР и последующего анализа фрагментов ДНК путём ПДРФ-анализа. Анализ STR-гаплотипов внутри гаплогрупп проводили с использованием 36 микросателлитных маркеров не-рекомбинирующей части Y-хромосомы (YSTR) (DYS19, 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 426, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 442, 444, 445, 448, 456, 458, 461, 504, 505, 525, 531, 537, 552, 635, YCAIIa, YCAIIb, GATA H4.1, Y-GATA-A10, GGAAT1B07). STR-маркеры генотипировали методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3730 в присутствии стандартов длины молекул ДНК с использованием программного обеспечения GeneMapper. Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Оценку генетического разнообразия в исследуемых популяциях производили по формуле Нея [6]. Генетическую дифференциацию оценивали путём анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) [7]. Использовали коэффициент Fst, проводя 10000 пермутаций исходного массива данных. Статистическую значимость межпопуляционных различий оценивали точным тестом популяционной дифференциации (уровень значимости = 0,05). Матрицы попарных дистанций Слаткина (Fst) рассчитывали, используя 1000 пермутаций исходного массива данных. Расчеты проводили в программном пакете ARLEQUIN 3.5.1.2. [7]. Генетические взаимоотношения между популяциями выявляли методом многомерного шкалирования. Анализ и построение графиков проводили с использованием пакета программ Statistica 7.0.

### Результаты и обсуждение

Показателем возможного родства между представителями разных фамилий является принадлежность к одной гаплогруппе. Если два человека принадлежат к разным гаплогруппам, между ними не может быть близкого родства по мужской линии. Если же два человека принадлежат к одной гаплогруппе, то возможность близкого родства между ними существует, но оценить степень этого родства только по принадлежности к гаплогруппе невозможно. Генетическое родство можно определить по близости YSTR-гаплотипов. Это позволяет существенно детализировать генотип конкретного образца и выйти на новый уровень оценки дифференциации генофонда популяций. В частности, внутри отдельных гаплогрупп (например, N1a2b2a2-VL67) у представителей одного этноса мы обнаруживаем существенно различающиеся кластеры YSTR-гаплотипов. Вместе с тем, отдельные кластеры гаплотипов включают в себя образцы, относящиеся к разным этносам. Например, такие общие линии выявлены у хакасов и тувинцев, хакасов и шорцев, сибирских татар и телеутов и т.д. Как правило, они маркируют различные независимые по происхождению миграционные явления на территории Южной Сибири.

Бутанаев В.Я. выделяет 6 этнографических групп хакасов: качинцы, койбалы, сагайцы, бельтиры, бирюсинцы, кызыльцы. В XIX веке основное деление происходило по принадлежности к административным родам. Перечисленные выше сеоки, к которым принадлежат протестированные люди, входили в состав следующих административных родов: Бельтирский (сеоки бельтир, сарыг, табан, хахпына, чыстар), Ближнекаргинский (сайын, харга), Дальнекаргинский (туран), Изушерский (таяс, халар), Мрасско-Изушерский (кечин, таяш), Карачерский (сор, чилей), Казановский (том), Кивинский (хобый), Кийский (хый), Кызыльский (хызыл хая), Кубанов (сохы), Мунгатов (ызыр), Татаров (пурт), Шалошин (хасха), Таражаков (хан), Тубинский (хыргыс) и Сагайский (сагай, сойыт).

По результатам генотипирования удалось выявить в большинстве сеоков основную гаплогруппу, носителей которой среди исследованной выборки образцов этого рода абсолютное большинство. Сравнительный анализ гаплотипов убедительно показал, что представители одного сеока в большинстве не только принадлежат к одной гаплогруппе, но и являются родственниками по мужской линии и чаще всего восходят к одному родоначальнику, жившему в относительно недалеком прошлом. В подавляющем большинстве случаев у представителей одного сеока обнаруживается и общность YSTR-гаплотипов. Для сеоков, количество представителей-мужчин из которых оказалось не менее пяти, провели оценку дифференциации с использованием AMOVA [7], выявившую огромную долю различий между сравниваемыми единицами (сеоками)  $F_{st} = 51\%$ . Для внутриэтнического уровня это гигантские различия в рамках

выбранной маркерной системы. Это означает, что генофонд хакаского этноса, а точнее часть, маркируемая гаплогруппами Y-хромосомы, структурирована прежде всего по родовому принципу. Именно этот уровень организации генофонда этноса как единой системы наиболее точно характеризует его популяционную структуру.

Таким образом, результаты генетического анализа доказывают, что сеок является, прежде всего, объединением родственников по отцовской линии. Конечно, не во всех сеоках приписанные к ним образцы принадлежали к одной гаплогруппе и одному кластеру гаплотипов, но это явилось скорее исключением из общего правила. Возможно несколько причин такой генетической неоднородности различных родов. Во-первых, в отдельных случаях возможно наследование фамилии по материнской линии, либо не по линии биологического отца. Во-вторых, может иметь место изначальная небольшая неточность этнографических данных, так, фамилия могла принадлежать другому сеоку или быть представлена в разных. Частично это учитывалось нами: например, фамилия Боргояков представлена в двух сеоках — харга (N1a2b2a2-VL67) и хобый (N1a1a2-B499). В-третьих, возможна исходная генетическая гетерогенность сеока. Рассмотрим подробнее полученные результаты.

*Бельтиры.* Группа является генетически гетерогенной. Сеоки пилтыр и чыстар представлены в основном образцами гаплогруппы R1a1a1b2-Z93(xZ94), сарыг и табан — N1a2b2a2-VL67, хахпына — Q1b1a3b-YP1102. Это полностью соответствует данным Л.П. Потапова о том, что название «бельтиры» представляло собой, по-видимому, собирательное географическое наименование, означающее в переводе на русский язык «устыинцы» (т.е. живущие в устьях рек). В XVIII в. они представляли собой тюркоязычную группу, довольно смешанную в этническом отношении. Согласно распространенным легендам, бельтиры образовались преимущественно из выходцев из Тувы. Практически все образцы сеока хахпына совпадают по YSTR-гаплотипам с образцами Q1b1a3b-YP1102 найденными у тувинцев (собственные неопубликованные данные), что подтверждает исторические предания.

*Бирюсинцы.* Разделяются на три группы сеоков по принадлежности к гаплогруппам. Отличительной особенностью сеоков хый и хобый является доминирование по частоте гаплогруппы N1a1a2-B499, что не наблюдается больше не в одном другом хакаском сеоке. Таким образом, эти два сеока объединяют в себе отдельный генетический компонент, не характерный для других хакасов. Дальнекаргинский род: сеок туран — R1a1a1b2-Z93(xZ94). Кызыльский род: хызыл хая — R1a1a1b2-Z93(xZ94). Изушерский род: сеоки таяс, халар и чити пуур — R1a1a1b2-Z93(xZ94). Мрасско-Изушерский род: сеоки кичин и таяш — R1a1a1b2-Z93(xZ94). Карачерский род: сеоки сор и чилей — R1a1a1b2-Z93(xZ94). Казановский род: том —

N1a2b2a2-VL67. Ближнекаргинский род: сеоки сайын и харга — N1a2b2a2-VL67. Кивинский и Кийский роды: сеоки хобый и хый — N1a1a2-B499.

Наличие одинаковых гаплогрупп и близость гаплотипов показывают, что административные рода, на которые делились бирюсинцы в XIX веке, представляют собой объединение родственных друг другу сеоков. Наиболее близкими между собой оказались: Кивинский и Кийский роды (N1a1a2-B499), Изушерский, Мрасско-Изушерский и Карачерский роды (R1a1a1b2-Z93(xZ94)), сеоки харга и сайын Ближнекаргинского рода бирюсинцев (N1a2b2a2-VL67), которые, согласно многочисленным данным, относятся к шорским родам. Даже в названии родов: Изушерский, Мрасско-Изушерский и Карачерский содержится указание на их связь с шорцами (окончание -чер, -шер). Генетически близки к ним бельтирские сеоки пилтыр и чыстар, бирюсинские сеоки туран и хызыл хая.

Сеоки хый и хобый, несмотря на тесное генетическое родство, сильно отличаются по гаплотипическому разнообразию в пределах гаплогруппы N1a1a2-B499. Для хый оно невелико, поскольку имеется всего семь гаплотипов. Для хобый разнообразие значительно выше (18 гаплотипов), что говорит о значительном времени, прошедшем с момента основания этого сеока.

*Качинцы.* Кубанов род (сеок соххы), Мунгатов род (сеок ызыр), Татаров род (сеок пурт), Шалошин род (сеоки пурт и хасха) выделяются тем, что практически все сеоки полностью состоят из носителей гаплогруппы N1a2b2a2-VL67 с весьма специфическим спектром YSTR-гаплотипов. Результаты сравнительного анализа

убедительно свидетельствует о близком родстве между сеоками хасха и соххы. Несколько удалены от них сеоки ызыр и пурт. Полученные результаты не противоречат общепринятым версиям этногенеза хакасского народа, но заставляют по-новому взглянуть на этот процесс.

Результаты генетического анализа доказывают, что хакасские сеоки являются, прежде всего, объединением родственников по отцовской линии. Для подавляющего большинства образцов показана тесная генетическая близость представителей одного сеока.

### Список литературы

1. Тюркские народы Сибири / отв. ред. Д.А. Функ, Н.А.Томилов; Ин-т этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН; Омский филиал Института археологии и этнографии СО РАН. 2006. М.: Наука, 678с.
2. Бутанаев В.Я. Происхождение хакасов по данным этнонимии // Проблемы археологии и этнографии. — Л., 1983. — Вып. 2. — С. 68-73.
3. The Y-Chromosome Consortium. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups // Genome Research. 2002. V. 12. P. 339-348.
4. <http://www.isogg.org/>
5. Ilumae A.-M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al. Human Y-chromosome haplogroup N: a non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // Am.J.Hum.Genet. 2016. V. 99. P.163-173.
6. Nei M. Molecular evolutionary genetics / New York: Columbia Univ. Press. 1987.
7. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. // Evolutionary Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47-50.

# Частота и спектр хромосомных микродупликаций у пациентов с нарушениями умственного развития

Беляева Е.О.<sup>1\*</sup>, Кашеварова А.А.<sup>1</sup>, Скрябин Н.А.<sup>1</sup>, Лопаткина М.Е.<sup>1</sup>,  
Салюкова О.А.<sup>1,2</sup>, Филимонова М.Н.<sup>1</sup>, Лежнина О.В.<sup>1</sup>, Шорина А.Р.<sup>3</sup>,  
Масленников А.Б.<sup>4</sup>, Назаренко Л.П.<sup>1,2</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

<sup>3</sup> ГБУЗ Новосибирской области «Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер», Новосибирск

<sup>4</sup> ГБУЗ Новосибирской области «Городская больница № 1», Новосибирск

\* e-mail: eo-belyaeva@mail.ru

У пациентов с интеллектуальной недостаточностью и нарушениями развития описано более 230 микроделечий и только порядка 80 микродупликаций с доказанной патогенетической значимостью. Факт зарегистрированного дисбаланса по числу CNV с преобладанием микроделечий может являться косвенным подтверждением устоявшегося мнения, что микродупликации являются менее патогенными ввиду более мягкого клинического проявления. Цель исследования — определить частоту и спектр патогенетически значимых хромосомных микродупликаций у пациентов с нарушениями умственного развития, оценить соотношение клинически значимых микродупликаций и микроделечий в данной группе больных. Выборка сформирована из 216 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет: дети, страдающие нарушениями умственного развития и имеющие дизморфии и/или врожденные аномалии. Поиск хромосомных микродупликаций проводился методом матричной сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (8х60К, Agilent Technologies). Для подтверждения обнаруженных у пробандов сегментных трисомий и определения их происхождения использовался метод количественной ПЦР в режиме реального времени. Среди выявленных патогенетически значимых вариаций числа копий участков ДНК, зарегистрированных у 81 пациента с нарушениями умственного развития (37%), несбалансированные транслокации или комбинации разных типов CNVs идентифицированы у 9 человек, 2 пациента явились носителями кольцевых хромосом 13 и 22, у 70 больных обнаружено 36 делеций и 34 дупликации, соотношение которых составило 51% и 49% соответственно. При анализе происхождения частичных трисомий установлено, что в 8 случаях (47%) микродупликации возникли *de novo*, а в 9 случаях (53%) были унаследованы от фенотипически здоровых родителей. Частота клинически значимых хромосомных микродупликаций в группе пациентов с нарушениями умственного развития составила 15,7%, микроделечий — 16,7%. Равнопредставленность полярных изменений копийности ДНК в нашем исследовании, вероятно, может указывать на недоучет микродупликаций как причины развития патологии и на важность их более детального изучения.

**Ключевые слова:** нарушения умственного развития, вариации числа копий участков ДНК, хромосомные микродупликации, матричная сравнительная геномная гибридизация.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-10229.

## Prevalence and spectrum of chromosomal microduplications in patients with mental retardation

Belyaeva E.O.<sup>1\*</sup>, Kashevarova A.A.<sup>1</sup>, Skryabin N.A.<sup>1</sup>, Lopatkina M.E.<sup>1</sup>,  
Salyukova O.A.<sup>1,2</sup>, Filimonova M.N.<sup>1</sup>, Lezhnina O.V.<sup>1</sup>, Shorina A.R.<sup>3</sup>,  
Maslennikov A.B.<sup>4</sup>, Nazarenko L.P.<sup>1,2</sup>, Lebedev I.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Tomsk

<sup>3</sup> «Novosibirsk City Clinical Hospital № 1» Novosibirsk

<sup>4</sup> «Novosibirsk Regional Children's Clinical Psychoneurologic Dispensary» Novosibirsk

\* e-mail: eo-belyaeva@mail.ru

To date, more than 230 microdeletion and 80 microduplication syndromes were revealed in patients with intellectual deficiency and developmental delay. The fact that deletions predominate may be an indirect confirmation of the established opinion that microduplications are less pathogenic in case of a milder clinical manifestation. The aim of the study was to determine the frequency and spectrum of pathogenetically significant chromosomal microduplications among patients with disabilities of mental development, to estimate the ratio of clinically significant microdilutions and microdeletions in this group of patients. The sample consists of 216 patients aged 2 to 18 years: children with mental development disorders, and having dysmorphia and/or congenital anomalies. The

search for chromosomal microduplications was carried out using matrix comparative genomic hybridization on microarrays (8x60K, Agilent Technologies). To confirm the segmental trisomy identified in the probands and determine their parental origin, a quantitative real-time PCR method was used. Among the detected pathogenetically significant variations in the number of copies of DNA regions registered in 81 patients with mental development disorders (37%), unbalanced translocations or combinations of different types of CNVs were identified in 9 patients, 2 patients were carriers of ring chromosomes 13 and 22, 70 patients were found with 36 deletions and 34 duplications, the ratio of which was 51% and 49% respectively. In the process of analyze of the origin of partial trisomy it was established that 8 cases (47%) of microduplication appeared *de novo* and 9 cases (53%) were inherited from phenotypically healthy parents. The frequency of clinical significant chromosomal microduplications in the group of patients with mental development disorders was 15,7%, microdeletions — 16,7%. Perhaps this confirms the underestimation of microduplications as a cause of the development of pathological conditions and points to the importance of their more detailed study.

**Keywords:** disabilities of mental development, copy number variation, chromosomal microduplications, array-CGH.

### Введение

Нарушения умственного развития являются одной из самых распространенных причин инвалидности в мире. Встречаясь у 1—3% населения [1], они представляют социально-значимую проблему. Эти нарушения могут возникать как вследствие неблагоприятных экзогенных влияний, так и обуславливаться генетическими факторами, которые, к сожалению, нередко остаются недифференцированными. Исследования генетической компоненты становятся более доступными в связи с развитием геномных технологий, внедрение в клиническую практику которых привело к описанию новых синдромов, связанных с микроструктурными хромосомными aberrациями (синдромы микроделетий и микродuplicаций). Микроделетии и микродuplicации — это вариации числа копий участков ДНК (CNVs), имеющие размер до 5 млн п.н. и не выявляемые при стандартном цитогенетическом исследовании (кариотипировании). Несмотря на то, что показана связь многих хромосомных микроперестроек с известными синдромами, большая их часть является редкой и представлена единичными наблюдениями. В настоящее время CNVs рассматриваются как одна из ведущих причин нарушений умственного развития. У пациентов с данной патологией описано более 230 микроделетсионных, но только порядка 80 микродuplicационных синдромов [2]. Обращает на себя внимание тот факт, что патогенных микродuplicаций примерно в три раза меньше, чем микроделетий, в связи с чем возникает вопрос о недооценке их значения в формировании патологических состояний.

*Целью настоящего исследования* явился поиск патогенетически значимых хромосомных микродuplicаций, определение их частоты и спектра у пациентов с нарушениями умственного развития и сравнение с частотой встречаемости клинически значимых микроделетий в данной группе больных.

### Материалы и методы

Обследовано 216 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет (дети, страдающие нарушениями умственного развития и имеющие дизморфии и/или врожденные аномалии) методом матричной сравнительной геномной гибридизации на чипах (array CGH). Исследование одобрено Комитетом по

биомедицинской этике НИИ медицинской генетики ТНИМЦ и проводилось после получения информированного согласия родителей пробандов. Поиск микроструктурных хромосомных aberrаций осуществлялся на микрочипах Human Genome CGH SurePrintG3 HumanCGH 8x60K (Agilent Technologies, США), согласно рекомендациям производителя [3]. Результаты были визуализированы в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация клинической значимости CNVs проводилась с использованием Базы данных геномных вариантов (DGV) и онлайн-версии Каталога наследственных болезней «Менделеевское наследование у человека» (OMIM). С целью подтверждения наличия обнаруженных патогенетически значимых микродuplicаций у пробандов и определения их происхождения были подобраны праймеры и проведена количественная ПЦР в режиме реального времени на приборе AgiaMXReal-TimePCRSytem (Agilent Technologies, США).

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного молекулярно-цитогенетического исследования у 135 индивидов из 216 (63%) не выявлены CNVs или зарегистрированы варианты, относящиеся к категории полиморфных. У 81 пациента (37%) обнаружены патогенные и потенциально патогенные CNVs. Среди данной группы 9 человек имели несбалансированные транслокации или комбинации разных типов CNVs, 2 пациента — кольцевые хромосомы 13 и 22, образование которых обусловлено микроделетиями 13q34 и 22q13 (синдром Фелан-МакДермид, OMIM 606232) соответственно [4, 5]. Сочетания терминальных делетий и дuplicаций, указывающих на несбалансированную транслокацию, описаны у 5 пациентов: del5p15.33-p15.1 (15 млн п.н.) и dup5q33.3-q35.3 (24,7 млн п.н.); del9p24.3 (1,4 млн п.н.) и dup16p13.3-p13.11 (16,1 млн п.н.); dup4p16.3-p15.32 (18,4 млн п.н.) и del9p24.3-p22.1 (18,8 млн п.н.); del5p15.33 и dup8q24.22-q24.3 у двух sibсов. Еще у 4 пациентов показаны различные сочетания: dup4q34.1-q34.3 (5,9 млн п.н.), trip4q34.3-q35.2 (5,9 млн п.н.) и del4q35.1-q35.2 (5,6 млн п.н.); dup17p13.3 (732 т.п.н., OMIM 613215) и dup22q11.1-q12.2 (13,97 млн п.н.); del1q21.1 (115 т.п.н., OMIM 274000) и del22q11.21 (2,5 млн п.н., OMIM 188400, 192430); del9p24.3-p24.2 (3 млн п.н.), dup9p24.3-p13.3



(32,2 млн п.н.) и dup9p21.1-p13.3 (3,6 млн п.н.). Вклад определенной CNV в формирование аномального фенотипа при наличии нескольких вариаций у одного больного сложно оценить, поскольку их влияние может быть сочтанным, либо обусловлено модифицирующим или кумулятивным эффектом.

У 70 детей, имеющих патогенные и потенциально патогенные CNVs, идентифицировано 34 дупликации и 36 делеций, что в общей группе пациентов с умственной отсталостью составило соответственно 15,7% и 16,7%.

В обследованной нами выборке идентифицировано 9 известных микроделеционных и микродупликационных синдромов у 12 пациентов. Среди микроделений выделено 7 синдромов: микроделеции регионов 1p36 (OMIM 607872), 7q11.23 (синдром Вильямса, OMIM 194050), 15q11-q13 (синдром Прадера-Вилли, OMIM 176270, 2 случая), 15q24 (OMIM 613406, 2 случая), 16p11.2-p12.2 (OMIM 613604, 2 случая), проксимальной микроделеции 22q11.2 (включая синдром Ди Джорджи (OMIM 188400) и велокардиофациальный (OMIM 192430)). Среди микродупликаций только 2: синдромы проксимальной и дистальной микродупликации 1q21.1 (OMIM 612475) и микродупликации 15q11-q13 (OMIM 608636).

Для 18 обнаруженных нами хромосомных микродупликаций была проведена подтверждающая диагностика методом количественной ПЦР в режиме реального времени (таблица). В большинстве случаев (у 13 больных) частичные трисомии оказались уникальными с вовлечением следующих хромосомных сегментов —

1q25.1-q25.2, 2p12-p11.2, 2p25.3-p25.2, 3p26.3, 5p15.2-p14.1, 5q33.1, 6p21.2-p12.2, 6p22.2, 7q34, 10q26.3, 14q11.2, 18p11.31, 20q13.12. И лишь для двух регионов (12p13.31, 12q24.12) зарегистрировано по две аналогичные микродупликации. Один пациент явился носителем впервые выявленной трипликации 4q21.21-q21.22, протяженностью 1,6 млн п.н., перекрывающейся с минимальной критической областью для известного синдрома микроделеции 4q21 (OMIM 613509) [6].

Впервые выявленные сегментные трисомии, ранее не описанные в литературе, установлены для 12 хромосомных регионов из 15. Патогенная или вероятно патогенная значимость микродупликаций определялась размерами перестройки, происхождением, количеством и статусом генов внутри абберации. Показано, что размер менее 500 т.п.н. характерен, как правило, для полиморфных вариантов, а более протяженные изменения копийности ДНК имеют выраженный патогенетический эффект. Большинство патогенных вариаций имеют размер более 1 млн п.н. Протяженные дупликации выявлены нами у двух пробандов dup5p15.2-p14.1 (15,8 млн п.н.) и dup6p21.2-p12.2 (11,47 млн п.н.). Особое значение имеет анализ генного состава CNV: чем большее количество генов содержит CNV, тем более вероятно, что она лежит в основе клинических признаков пациента. При этом необходимо учитывать функции генов, имеющие отношение к нарушению интеллектуального развития. Сложностью при определении патогенетической значимости дупликаций является природа их возникновения: *de novo*

Таблица

Подтвержденные патогенные и потенциально патогенные CNVs

Пациент	Регион	Кординаты (hg18)	Размер, млн п.н.	Происхождение
1	dup1q25.1-q25.2	chr1:172269000-178409000	6,14	Отцовское
2	dup2p12 – p11.2	chr2:75923094-83749392	7,82	<i>De novo</i>
3	dup2p25.3-p25.2	chr2:632724-6052614	5,42	<i>De novo</i>
4	dup3p26.3	chr3:701645-1467721	0,77	Отцовское
5	trip4q21.21-q21.22	chr4:82189943-83801062	1,61	<i>De novo</i>
6	dup5p15.2-p14.1	chr5:12625661-28429732	15,8	<i>De novo</i>
7	dup5q33.1	chr5:148620000-148735000	0,11	Материнское
8	dup6p21.2-p12.2	chr6:40109825-51588796	11,47	Материнское
9	dup6p22.2	chr6:25677000-26393000	0,71	—
10	dup7q34	chr7:137850612-138121572	0,27	<i>De novo</i>
11	dup10q26.3	chr10:131662281-134969700	3,31	<i>De novo</i>
12	dup12p13.31	chr12:7696275-7894740	0,2	Материнское
13	dup12p13.31	chr12:7696275-7894740	0,2	Материнское
14	dup12q24.12	chr12:110668504 -110853677	0,19	Материнское
15	dup12q24.12	chr12:110668504-110793312	0,12	Материнское
16	dup14q11.2	chr14:20767632-22722130	1,9	<i>De novo</i>
17	dup18p11.31	chr18:7005750-7050714	0,05	<i>De novo</i>
18	dup20q13.12	chr20:42595506-43137505	0,54	Отцовское

или унаследованные. Микродупликации часто наследуются от кого-либо из условно здоровых родителей, поэтому считаются не патогенными и принимаются за случайные находки, а не причины патологий. В таком случае можно предположить, что такие CNVs представляют собой геномные полиморфизмы. В нашем исследовании для сегментных трисомий, обнаруженных у пробандов, был проведен анализ происхождения с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени с предварительным подбором праймеров. Семейный материал (родителей, в некоторых случаях бабушек и дедушек) был доступен в 17 случаях. В результате идентифицированные микродупликации в 8 случаях (47%) имели происхождение *de novo*, а в 9 случаях (53%) были унаследованы от фенотипически здоровых родителей; в 33% случаев выявленные изменения были отцовского происхождения, в 67% — материнского. Следует предполагать, что наследуемые делеции и дупликации могут иметь неполную пенетрантность, переменную экспрессивность или затрагивать импринтированные локусы, ассоциированные с нарушениями умственного развития.

В ситуации показанной нами равнопредставленности полярных изменений копийности генов (в нашей работе соотношение по числу делеций и дупликаций составило практически 1:1) правомерен вопрос о недооценке роли микродупликаций в развитии патологии, в частности, при умственной отсталости. Подавляющее число работ по исследованию пациентов с психоневрологическими нарушениями, задержкой развития, врожденными аномалиями и дизморфиями демонстрируют преобладание делеций в группе зарегистрированных CNVs с патогенетической значимостью. К примеру, группа исследователей Park с соавторами обнаружила 8,3% патогенных CNVs в выборке из 407 пациентов с вышеобозначенными фенотипическими признаками, среди 34 выявленных дисбалансов 68% составили делеции (23 случая), а 32% — дупликации (11 случаев) [7]. Эти данные сопоставимы с результатами работ других учёных: у 52 из 329 больных выявлено 64% делеций (33 случая) и 36% дупликаций (19 случаев), которые обусловили 16% обнаруженных патогенных CNVs [8]; а также 61% делеций (65 CNVs) и 39% дупликаций (42 CNVs) установлено у 65 пациентов из 214 (30% патогенных CNVs) [9].

Частичное прояснение проблемы более редкого выявления патогенных дупликаций может содержаться в процессе возникновения реципрокных CNVs. Известно, что основным генетическим механизмом, обуславливающим генерацию таких нарушений, является внутри- или межхромосомная неаллельная гомологичная рекомбинация (NAHR). Однако при внутривнутрихроматидной NAHR реципрокные дупликации отсутствуют [10]. Также гено-фенотипические корреляции при дупликациях не столь однозначны, как при делециях. И если очевидно, что делеции приводят к гаплонедостаточности, то дупликации в зависимо-

сти от точек разрыва, могут быть как нейтральными, так и приводить к реализации патологического фенотипа через усиление функции или снижение/потерю функции гена. Кроме того, дупликации принято считать менее патогенными, по сравнению с делециями, возможно, ввиду особенностей их клинического проявления, которое является более мягким и переменным, в результате чего некоторые признаки могут остаться незамеченными врачом.

Таким образом, выявленная в нашей работе равнопредставленность патогенетически значимых полярных изменений копийности ДНК, в отличие от преобладающих аналогичных исследований, регистрирующих дисбаланс по числу клинически значимых CNV с преобладанием делеций, вероятно, может указывать на недоучет микродупликаций как причины развития патологических состояний и на важность их более детального изучения. Подробная клинико-генетическая характеристика пациентов с патогенными микродупликациями может привести в дальнейшем к выделению новых синдромов, ассоциированных с нарушениями умственного развития.

#### Список литературы

1. Khan MA, Khan S, Windpassinger C et al. The Molecular Genetics of Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability: a Mutational Continuum and Future Recommendations. *Ann Hum Genet.* 2016; 80(6):342-368.
2. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Геномная архитектура хромосомных болезней человека // *Генетика.* 2016. 52. № 5. С.511-528.
3. Протокол CGH для микрочипов Agilent Technologies — [http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3\\_1\\_CGH\\_ULS\\_Protocol.pdf](http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf)
4. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Траектории интерпретации фенотипа и кариотипа через призму взаимодействия врача-генетика и лабораторного генетика. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. 2017; 26:47-55.
5. Беляева Е.О., Кашеварова А.А., Никонов А.М. и др. Значимость молекулярного кариотипирования для уточнения диагноза при цитогенетически визуализируемой хромосомной патологии. *Медицинская генетика.* 2016; 7:17-20.
6. Lebedev IN, Nazarenko LP, Skryabin NA et al. A *de novo* microtriplication at 4q21.21-q21.22 in a patient with a vascular malignant hemangioma, elongated sigmoid colon, developmental delay, and absence of speech. *Am J Med Genet A.* 2016; 170(8):2089-2096.
7. Park, Sang-Jin, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular cytogenetics.* 2011; 4(1):12.
8. D'Arrigo S. et al. The diagnostic yield of array comparative genomic hybridization is high regardless of severity of intellectual disability/developmental delay in children. 2016; 31(6):691-699.
9. Cappuccio, Gerarda, et al. New insights in the interpretation of array-CGH: autism spectrum disorder and positive family history for intellectual disability predict the detection of pathogenic variants. *Italian journal of pediatrics.* 2016; 42(1):39.
10. Carvalho C, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat. Rev. Genet.* 2016; 17(4):224-238.

# Фенотипическая вариабельность у пациентов с *de novo* X-аутосомными несбалансированными транслокациями

Маркова Ж.Г., Миньженкова М.В., Тарлычева А.А., Цветкова Т.Г., Галкина В.А., Шилова Н.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, zhmark71@mail.ru

Транслокации с участием хромосомы X и аутосомы являются довольно редким событием и характеризуются значительной вариабельностью фенотипа. Несбалансированные X-аутосомные транслокации могут приводить как к множественным врожденным порокам и задержке развития, так и вызывать только дисгенезию гонад без умственной отсталости и других аномалий фенотипа. Представлены данные клинического, цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования двух пациентов с несбалансированными X-аутосомными транслокациями *de novo* с различными фенотипическими проявлениями, которые могут быть объяснены характером инактивации перестроенной X хромосомы.

**Ключевые слова:** X-аутосомная транслокация, FISH, инактивация X хромосомы.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## Phenotypic variability in patients with *de novo* unbalanced X-autosomal translocations

Markova Zh.G., Minzhenkova M.V., Tarlicheva A.A., Tsvetkova T.G., Galkina V.A., Shilova N.V.

Federal Budgetary State Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation, zhmark71@mail.ru

Translocations involving an X chromosome and an autosome are rare and are associated with a variable phenotype. Most unbalanced X-autosomal translocations result in multiple abnormalities; a smaller proportion cause gonadal dysgenesis without other anomalies or mental retardation. We present clinical, cytogenetic and molecular cytogenetic findings of two patients with *de novo* unbalanced X-autosomal translocations with different phenotypic features which may be explained by the pattern of inactivation of the derivate chromosome X.

**Key words:** unbalanced X-autosome translocations, FISH, chromosome X inactivation.

### Введение

Транслокации между хромосомой X и аутосомами достаточно редки и встречаются с частотой 1:300000 [1]. Как сбалансированные, так и несбалансированные варианты X-аутосомных транслокаций отличаются большей вариабельностью клинических проявлений и имеют особенности, связанные с феноменом инактивации хромосомы X [2–4].

Как известно, в соматических клетках здоровых женщин одна хромосома X подвергается инактивации, компенсируя дозу генов у двух полов. Инактивация происходит в период раннего эмбрионального развития. Транскрипционный сайленсинг инициируется случайным образом в центре инактивации (XIC), расположенном в районе Xq13 на любой из двух хромосом X и распространяется в обоих направлениях вдоль хромосомы. Это приводит к мозаицизму по двум клонам клеток, экспрессирующим аллели отцовских или материнских хромосом X. При этом не все гены в X-хромосоме инактивированы. Примерно 15% генов не подвергается инактивации и экспрессируется как в активных, так и неактивных хромосомах X. Большинство генов, избегающих инактивации, расположены на коротком плече хромосомы, меньшее количество — на длинном плече [5].

При несбалансированных X-аутосомных транслокациях инактивация дериватной хромосомы сопровождается распространением транскрипционного сайленсинга на аутосомный фрагмент [3]. При этом наблюдается неслучайная инактивация, когда в большинстве соматических клеток организма дериватная хромосома инактивируется, а нормальная хромосома X остается активной, что отражает вторичную селекцию против генетически несбалансированных клеток в период раннего эмбрионального развития [4].

### Материалы и методы

Хромосомные препараты для цитогенетического (GTG-banding) и молекулярно-цитогенетического (FISH) анализа получали из ФГА-стимулированной культуры лимфоцитов периферической крови по стандартным методикам.

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили по протоколам фирм-производителей. Использовались ДНК-зонды: на центромерный район хромосомы 18 (SE 18 (D18Z1), Kreatech, Нидерланды), субтеломерные районы хромосом 18 и X (Sub Telomere 18pter, Sub Telomere 18qter, Sub Telomere XYpter, Sub Telomere XYqter, Kreatech, Нидерланды), а также mBAND X, mBAND

12, mBAND 18 и mFISH (MetaSystems, Германия). Для гибридизации ДНК-зондов использовалась система ThermoBrite (Abbott Molecular, США). FISH-анализ проводился на люминисцентном микроскопе AxioImager.M1 (ZEISS, Германия) с использованием программы анализа изображения Isis (MetaSystems, Германия).

### Результаты

Представлены клинические, цитогенетические и молекулярно-цитогенетические данные двух пациентов с несбалансированными X-аутосомными транслокациями, возникшими *de novo*.



Рис. 1. Фрагмент метафазной пластинки с дериватной хромосомой X в результате транслокации 46,X,der(X)t(X;18)(p22.3;p11.32)dn.

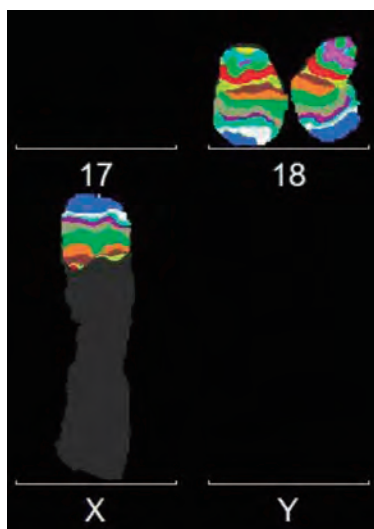


Рис. 2. Результат mBAND 18 — дериватная хромосома X вследствие t(X;18).

*Случай 1.* Пробанд, 14-летняя девочка, с подозрением на синдром Шерешевского—Тернера. При осмотре пациента врачом-генетиком отмечены низкий рост, укороченная шея, расширенная и уплощенная грудная клетка, гипертелоризм сосков, деформация и укорочение предплечий, специфическое строение ногтевого ложа (ногтевая пластинка узкая, ноготь гипоплазирован), клинодактилия 2-х пальцев рук, отсутствие вторичных половых признаков, нормальный интеллект.

Цитогенетический анализ выявил аномальный кариотип — 46,X,der(X)t(X;18)(p22.3;p11.32)dn, (рис. 1).

При FISH-анализе с ДНК-зондами на центромерный район хромосомы 18, субтеломерные районы хромосом 18 и X установлено наличие в дериватной хромосоме неактивной центромеры хромосомы 18, отсутствие субтеломерных районов короткого плеча хромосомы 18 и материала короткого плеча хромосомы X. Таким образом, у пробанда выявлены делеция района p22.3→pter короткого плеча хромосомы X и дупликация района p11.32→qter хромосомы 18, подтвержденная mBAND 18 (рис. 2).

*Случай 2.* Пробанд, 2-летняя девочка с задержкой психомоторного и речевого развития и множественными врожденными аномалиями: постаксиальной полидактилией левой кисти, низко расположенными ушными раковинами, приросшей мочкой ушей, гипертелоризмом, широкой плоской переносицей, широкими первыми пальцами стоп, плосковальгусной установкой стоп, ангиомой на спине.

При стандартном цитогенетическом анализе культивированных лимфоцитов периферической крови выявлен аномальный кариотип с дополнительным материалом неизвестного происхождения на длинном плече хромосомы X. Анализ профиля гибридизации дериватной хромосомы X при mFISH показал, что на длинное плечо хромосомы X транслоцирован материал хромосомы 12 (рис. 3).

Дуплицированный район хромосомы 12 был идентифицирован при mBAND 12 как 12q23→12qter (рис. 4).

Кариотипы родителей нормальные. Таким образом, в результате комплексного молекулярно-цитогенетического исследования кариотип пробанда определен как 46,X,der(X)t(X;12)(q26;q23)dn.

### Обсуждение

Фенотип пациентов с несбалансированными X-аутосомными транслокациями значительно отличается от случаев, когда в транслокации участвуют две аутосомы.

Транслокации с участием хромосомы X и аутосомы являются уникальными в силу особенностей их генетического функционирования, которое связано с явлением асимметричной инактивации хромосомы или транскрипционного сайленсинга [1].

Механизм асимметричной инактивации при носительстве несбалансированной X-аутосомной перестройке может выглядеть следующим образом. В раннем эмбриональном развитии происходит случайная инактивация одной из хромосом X в каждой клетке. При инактивации перестроенной хромосомы X транскрипционный сайленсинг, инициированный в центре инактивации (Xq13), распространяется в обоих направлениях, в том числе и на аутосомный фрагмент, подавляя экспрессию генов и преобразуя структурную частичную трисомию в функциональную дисомию. В клетках с инактивированной нормальной хромосомой все аутосомные гены останутся активны, и эти клетки будут функционально не сбалансированы. Впоследствии соотношение клеточных линий изменяется за счет преимущественного выживания клеток с минимальным геномным дисбалансом, вплоть до полной элиминации всех клеток с активной дериватной хромосомой X.

Степень тяжести клинических проявлений частичной трисомии зависит от соотношения клонов клеток с активной и неактивной дериватной хромосомой X. Фенотип пациентов при 100%-ной инактивации перестроенной хромосомы X и максимальной инактивацией аутосомных генов может быть практически нормальным [6, 7]. Однако, по данным Шмид и соавт., до 25% носителей X-аутосомных перестроек имеют аномальный фенотип из-за присутствия клона с активной перестроенной хромосомой. Также отмечен тканеспецифичный мозаицизм, при котором у носителей X-аутосомных перестроек с аномальным фенотипом соотношение клонов составляло от 80:20 в крови до 30:70 в фибробластах кожи [8].

Вторым фактором, влияющим на формировании клинической картины у пациентов с несбалансированными X-аутосомными перестройками, является характер распространения и сохранения транскрипционного сайленсинга в аутосомном фрагменте перестроенной X-хромосомы. Известно, что транслоцированные аутосомные локусы инактивируются менее эффективно, чем собственные гены хромосомы X. Часть аутосомных ге-

нов остаются активными даже в инактивированной хромосоме X: они изначально избегают инактивации или неспособны достаточно эффективно сохранять инактивацию в процессе онтогенеза и подвергаются реинактивации [9]

Анализ данных литературы показывает корреляцию между ослаблением клинических проявлений частичной аутосомной трисомии и увеличением полноты инактивации аутосомных генов (таблица). В работе Sharp с соавт. проведен анализ распределения инактивации в аутосомном фрагменте перестроенной хромосомы X в 5 случаях несбалансированных X-аутосомных транслокаций (случаи 1–5). Во всех наблюдениях перестроенная хромосома X была инактивирована, но распределение инактивации в аутосомных фрагментах в каждом из пяти случаев было различным, что может отражать сложность каскада инактивации [10]. В случае 6 отмечалась поздняя репликация перестроенной X хромосомы и транслоцированного фрагмента хромосомы 18 в 98% клеток [11].

В сообщении White с соавт. [12] описывается несбалансированная транслокация между длинными плечами хромосом X и 4 у женщины с нормальным фенотипом (случай 7), при которой предполагается инактивация избыточного материала хромосомы 4. Авторы обнаружили, что 14 из 20 исследованных аутосомных локусов были инактивированы, при этом 6 локусов оставались

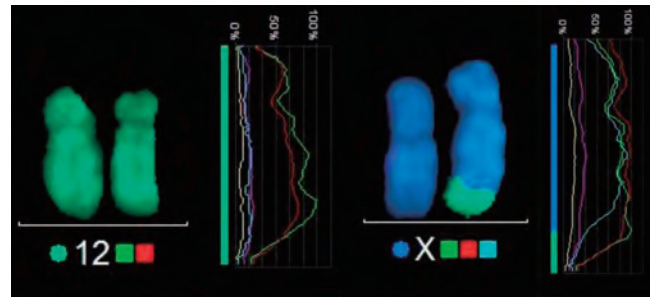


Рис. 3. Результат mFISH и профили гибридизации хромосом 12 и дериватной хромосомы X.

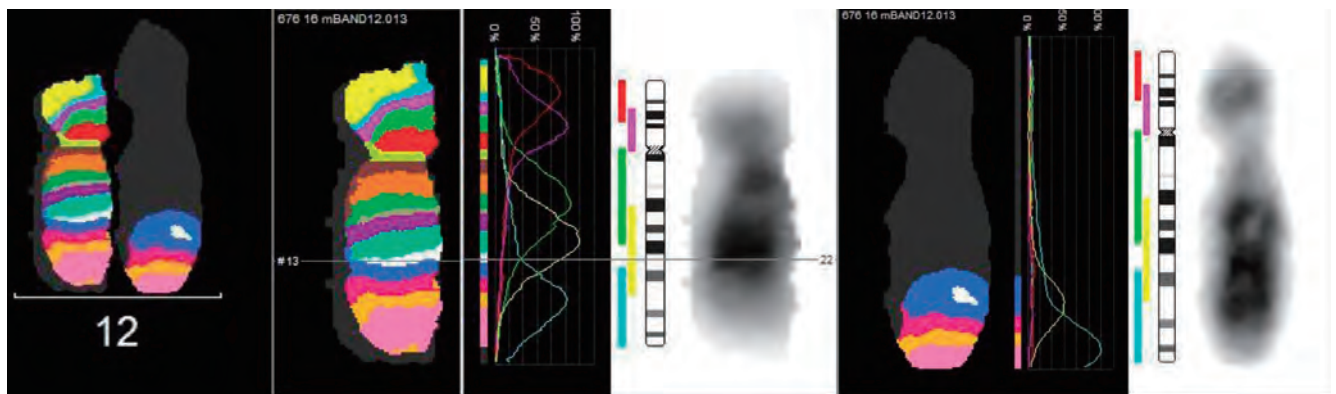


Рис. 4. Результат mBAND 12.

Фенотипические проявления и результаты анализа инактивации X хромосомы у пациентов с несбалансированными X-аутосомными транслокациями

№	Кариотип	Фенотип	Источник	Анализ инактивации
1	46,X,der(X)t(X;11) (q26.3;p12) <i>de novo</i> (pat)	Легкая задержка развития, крупное телосложение, короткая шея и незначительные лицевые дизморфии	Sharp, 2002	Непрерывная, почти полная
2	46,X,der(X)t(X;7) (q27.3;q22.3) mat	Ряд серьезных фенотипических аномалий с глубокой задержкой моторного развития и тяжелой степенью умственной отсталости	Sharp, 2002	Непрерывная, неполная, не во всех клетках
3	46,X,der(X)t(X;6) (p11.2;p21.1) mat	Умеренная задержка развития, трудности с обучением (IQ = 75) и низкий рост	Sharp, 2002	Прерывистая, неполная
4	46,X,der(X)t(X;6) (q28;p12) <i>de novo</i> (pat)	Задержка психомоторного и речевого развития, лицевые дизморфии	Sharp, 2002	Прерывистая, неполная
5	46,X,der(X)t(X;10) (q26.3;q23.3) mat	Вторичная аменорея	Sharp, 2002	Непрерывная, почти полная
6	der(X)t(X;18)(q27;q22)	Сниженный овариальный запас	Fusco, 2011	В 98% клеток
7	46, X, der (X) t (X; 4) (q22; q24)	Вторичная аменорея	White, 1998	Неполная
8	46,X,der(X)t(X;10) (q21.2;q11.2)	Задержка речи, лицевые дизморфии	Mononen, 2003	Почти полная

активными. Инактивированные гены были распределены вдоль всего аутосомного сегмента, что указывает на то, что инактивация распространилась на расстояние более 100 млн п.н. вдоль хромосомы. Пять из шести активных генов располагались интерстициально, с фланкированием инактивированными последовательностями с обеих сторон.

Исследования поздней репликации и анализ экспрессии транслоцированных аутосомных генов в случае 8 показали сложное распределение инактивации. Поздняя репликация отмечалась в медиальном районе (10q23-q25), но не в каждой клетке, а в наиболее проксимальной части транслоцированного хроматина длинного плеча хромосомы 10 — в каждой клетке [13].

Прерывистое распределение экспрессии аутосомных генов может быть связано с невосприимчивостью некоторых генов к сигналу инактивации или с неспособностью поддерживать инактивацию, что, в свою очередь, приводит к реактивации генов [2, 9]. Данное утверждение согласуется с исследованиями Hall с соавт. [14], когда при введении трансгенного XIST в аутосому человека в культуре клеток со временем наблюдалось уменьшение признаков инактивации. Вероятнее всего, к неполной инактивации аутосомных генов при X-аутосомных транслокациях может приводить сочетание нескольких факторов.

Представленные случаи несбалансированных X-аутосомных транслокаций *de novo* с различными фенотипическими проявлениями могут быть объяснены характером инактивации производной хромосомы X. Можно предположить, что в первом случае преимущественно инактивируется дериватная X хромосома. Распространение инактивации на транслоцированный

аутосомный сегмент объясняет отсутствие фенотипического эффекта дубликации значительного фрагмента хромосомы 18. Наличие делеции района p22.3→pter короткого плеча хромосомы X и, как следствие, функциональная моносомия локализованных в нем генов могут вносить вклад в клиническую картину, приводя к фенотипическим проявлениям синдрома Тернера.

У второго пациента фенотип в большей мере обусловлен дубликацией района q24→qter хромосомы 12 и делецией района q23→qter хромосомы X, что позволяет предположить в данном случае меньшее влияние инактивации дериватной хромосомы X, что может обуславливать аномалии фенотипа, сопровождающиеся задержкой психомоторного и речевого развития.

Таким образом, у пациентов с *de novo* X-аутосомными несбалансированными транслокациями отмечается значительная вариабельность фенотипических проявлений, степень тяжести которых невозможно спрогнозировать.

### Список литературы

1. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford monographs of medical genetics no. 6, Gardner RJ, Sutherland G, Shaffer LG (eds); Int. Oxford press 2012.
2. Lyon MF. Do LINEs have a role in X-chromosome inactivation? J Biomed Biotechnol. 2006; 2006(1):59746.
3. Минайчева ЛИ, Суханова НН, Назаренко ЛП, Вовк СЛ, Тимошевский ВА, Лебедев ИН, Кохно ТС. Случай редкой сбалансированной транслокации между хромосомами X и 13. Медицинская генетика. 2008. Том(5):38-40.

4. Pinheiro I, Heard E. X chromosome inactivation: new players in the initiation of gene silencing. Version 1. F1000Re. 2017; 6: F1000 Faculty Rev-344.
5. White WM, Willard HF, Van Dyke DL, Wolff DJ. The spreading of X inactivation into autosomal material of an X;autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;63(1):20-28.
6. Szvetko A, Martin N, Joy C, Hayward A, Watson B, Cary A, Withers S. Detection of Chromosome X;18 Breakpoints and Translocation of the Xq22.3;18q23 Regions Resulting in Variable. *Case Rep Genet*. 2012;2012:681747.
7. Sills ES, Cotter PD, Marron KD, Shkrobot LV, Walsh HM, Salem RD. Ovarian dysgenesis associated with an unbalanced X;6 translocation: first characterisation of reproductive anatomy and cytogenetic evaluation in partial trisomy 6 with breakpoints at Xq22 and 6p23. *Mol Med Rep*. 2012;5(1):29-31.
8. Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet* 42 : 161 — 169 , 1992 .
9. Popova BC, Tada T, Takagi N, Brockdorff N, Nesterova TB. Attenuated spread of X-inactivation in an X;autosome translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(20):7706-7711.
10. Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, Turner BM, Jacobs PA. Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet*. 2002;11 (25): 3145-3156.
11. Fusco F, Paciolla M, Chen E, Xu Li, Genesio R, Conti A, Jones J, Poeta L, Lioi MB, Ursini MV, Mian MG. Genetic and molecular analysis of a new unbalanced X;18 rearrangement: localization of the diminished ovarian reserve disease locus in the distal Xq POF1 region. *Hum Reprod*. 2011; 26(11):3186-3196.
12. White WM, Willard HF, Van Dyke DL, Wolff DJ. The spreading of X inactivation into autosomal material of an X;autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA. *The American journal of Human Genetics*. 1998;63(1):20-28.
13. Mononen T, Sharp A , Laakso, R-L Meltoranta M, Valve-Dietz A-K, Heinonen K Partial trisomy 10q with mild phenotype caused by an unbalanced X;10 translocation *J Med Genet* 2003;40:e61(<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/40/5/e61>)
14. Hall LL, Clemson CM, Byron M, Wydner K, Lawrence JB. Unbalanced X;autosome translocations provide evidence for sequence specificity in the association of XIST RNA with chromatin. *Hum Mol Genet*. 2002;11(25):3157-65.

## К 90-летию Доры Клавдиевны Верлинской

18 декабря 2017 года исполнилось 90 лет Верлинской Доре Клавдиевне — одному из первых в Советском Союзе специалистов по клинике и эпидемиологии хромосомных болезней человека.

Дора Клавдиевна окончила Первый Ленинградский медицинский институт в 1951 году. Работала заведующей сельской амбулаторией в Ленинградской области, затем участковым терапевтом в Ленинграде. В 1962 г. была принята на должность старшего лаборанта в Академическую группу по медицинской генетике при чл.-корр. АМН СССР Е.Ф. Давиденковой. В 1967 г. она стала младшим научным сотрудником и в 1968 г. защитила кандидатскую диссертацию «Клинические и цитогенетические исследования синдрома Шерешевского-Тернера». Она — соавтор первых в стране монографий по хромосомным болезням: «Хромосомные болезни человека» (1965) и «Болезнь Дауна» (1966). В 1973 г. группой Е.В. Давиденковой при участии Д.К. Верлинской была издана фундаментальная монография «Клинические синдромы при аномалиях половых хромосом».

Д.К. Верлинская внесла большой личный вклад в популяционные исследования частоты аномалий половых хромосом у жителей Ленинграда, выявление клинико-цитогенетических корреляций, анализ факторов, способствующих возникновению хромосомных болезней, и разработку методов реабилитации пациентов с такой патологией.

С 1982 года по настоящее время Дора Клавдиевна — руководитель методического кабинета Диагностического центра (медико-генетического). Она отвечает за мониторинг врожденных пороков развития в городе, ведет городской регистр семей с хромосомными болезнями, участвует в подготовке конференций и сборников трудов, проводит анализ работы отделений, результаты которого, имеют практическую и научную значимость. Большая эрудиция, аналитический ум и прекрасной память позволили ей удачно совмещать большую организационно-методическую работу с научной деятельностью. В 2000 г. она приняла участие в издании коллективной монографии «Комплексная реабилитация детей с хромосомными болезнями», а в 2007 г. — книги-атласа «Аномалии развития: иллюстрированное пособие для врачей». В общей сложности на счету Д.К. Верлинской более 150 научных и научно-практических публикаций, которые до сих пор востребованы и актуальны.

Трудно переоценить её неоценимый вклад в подготовку и воспитание специалистов в области медицинской генетики. Уже в 60-70-х годах прошлого века в условиях дефицита специальной литературы и курсов повышения квалификации по медицинской генетике Дора Клавдиевна вела большую работу с врачами, передавая им свои знания и опыт в этой области. Особенности медико-генетического



консультирования, правильного клинического осмотра, основы семиотики наследственных болезней и оценки результатов цитогенетического исследования — вот далеко не все темы, которыми Д.К. Верлинская щедро делилась с молодыми коллегами. При этом известный постулат Гиппократова «Не навреди!» был главным кредо её общения с подрастающей сменой врачей-генетиков.

Дора Клавдиевна — невысокая, стройная, всегда спокойная и уравновешенная женщина. Её несомненные достоинства — скромность, такт, умение выслушать и дать разумный совет. В то же время, она — веселый, жизнерадостный человек, фразы из ее стихов стали генетическими мемами, а её «Заздравная генетическая» широко известна многим врачам-генетикам постсоветского пространства:

Хочу Генетику воспеть,  
Для нас воскресшую недавно.  
Ей невозможно умереть,  
А быть забытой — и давно.

Пусть Грегор Мендель был монах,  
Науке он служил без страха.  
Сажал горох не в небесах,  
Давайте выпьем за монаха!

От Менделя прошли 100 лет  
До ДНК и хромосомы.  
Пусть не на все готов ответ,  
Но в генах мы почти как дома.

Нам хромосомы нипочем,  
Мы их себе служить заставим,  
Раскрутим, звенья разберем,  
Заменим-выбросим-добавим.

Чтоб не было незрячих глаз,  
Плохих мозгов и жидкой крови —  
На то Генетика у нас,  
Так выпьем за ее здоровье!

Доброго здоровья и благополучия Вам, дорогая Дора Клавдиевна! Желаем осуществления Ваших надежд на достойное будущее медицинской генетики, которой Вы посвятили более полувека своей трудной, но такой достойной жизни!

*Редколлегия журнала «Медицинская генетика», Правление Российского общества генетики человека, Правление СПб РО РОМГ, сотрудники Диагностического центра (медико-генетического) и лаборатории пренатальной диагностики ФГБНУ НИИ АГ и Р им. Д.О. Отта*



## Содержание журнала «Медицинская генетика» в 2017 г.

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №1 (175)

#### Научные обзоры

Петрова М.М., Пронина Е.А., Шнайдер Н.А.,  
Дмитренко Д.В., Строганова М.В., Боброва О.П.  
Роль мутаций потенциалзависимых натриевых каналов  
в патогенезе нейропатической боли .....3

#### Оригинальные исследования

Маркова Е.В., Татару Д.А., Преда О.Г.  
Фрагментный анализ полиморфизма (TG)<sub>m</sub>T  
интрона 8 гена *CFTF* .....11

Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П.,  
Гараева А.Ф., Колоколова О.В.,  
Жалсанова И.Ж., Пузырев В.П.  
Анализ генов цитокиновой сети  
в развитии «обратной» коморбидности  
для бронхиальной астмы и туберкулеза .....20

Цыганов М.М., Ибрагимова М.К.,  
Дерюшева И.В., Литвяков Н.В.  
Исследование однонуклеотидных полиморфизмов  
генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы:  
связь с экспрессией .....25

Спицын В.А., Макаров С.В., Карапетян М.К.,  
Бычковская Л.С., Балинова Н.В., Бец Л.В.,  
Алексеева Н.В., Асанов А.Ю., Спицына Н.Х.  
Молекулярно-генетическая изменчивость в гене *ABCC11*,  
кодирующем АТФ-связанный кассетный транспортный белок .....31

Шмарина Г.В., Пухальская Д.А., Букина А.М.,  
Авакян Л.В., Семькин С.Ю., Амелина Е.Л.,  
Красовский С.А., Усачева М.Ю., Алешкин В.А.  
Влияние однонуклеотидных полиморфизмов генов *TNF* и *LTA*  
на клинические параметры и маркеры воспаления  
у пациентов с муковисцидозом .....37

#### Информация

Правила оформления статей  
в журнале «Медицинская генетика» .....46

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №2 (176)

#### Научные обзоры

Шаповалова Д.А., Тюрин А.В.,  
Хуснутдинова Э.К., Хусаинова Р.И.  
Современные представления о генетике остеоартроза .....3

Цуканов А.С., Шельгин Ю.А., Семенов Д.А.,  
Пикунов Д.Ю., Поляков А.В.  
Синдром Линча. Современное состояние проблемы .....11

#### Оригинальные исследования

Петрина Н.Е., Близначев Е.А., Зинченко Р.А.,  
Макаев А.Х.-М., Петрова Н.В., Васильева Т.А.,  
Чудакова Л.В., Петрин А.Н., Поляков А.В., Гинтер Е.К.  
Частота мутаций гена *GJB2* у больных  
наследственной несиндромальной  
нейросенсорной тугоухостью  
в девяти популяциях Карачаево-Черкесской Республики .....19

Копытова А.Э., Николаев М.А., Усенко Т.С.,  
Мирошникова В.В., Баженова Е.А., Беркович О.А.,  
Баранова Е.И., Бровин Д.Л., Пантелеева А.А.,  
Семенова И.А., Беляева О.Д., Пчелина С.Н.  
Ассоциация ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* с уровнем  
мРНК в интраабдоминальной жировой ткани у женщин .....26

Иткис Ю.С., Бычков И.О., Михайлова С.В., Ильина Е.С.,  
Никитин В.В., Колпакчи Л.М., Федонюк И.Д., Зотина Е.И.,  
Пичкур Н.А., Цыганкова П.Г., Захарова Е.Ю.  
Фенотипические проявления митохондриальных заболеваний,  
обусловленных мутациями в гене *SCO2* .....30

Кудрявцева О.К., Барышева Е.М., Сорокина М.В.,  
Полшведкина О.Б., Иванова Н.В.,  
Полоников А.В., Бушуева О.Ю.  
Анализ взаимосвязи полиморфизма A/G (rs1801310) гена *GSS*  
с развитием миомы матки: пилотное исследование .....37

Батожаргалава Б.Ц., Мизерницкий Ю.Л.,  
Дьякова С.Э., Петрова Н.В., Зинченко Р.А.  
Роль полиморфных вариантов генов NO-синтазы и аргиназы  
при бронхиальной астме у детей .....40

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №3 (177)

#### Научные обзоры

Мингажева Э.Т., Прокофьева Д.С., Сакаева Д.Д.,  
Фаисханова Р.Р., Хуснутдинова Э.К.  
Роль вовлеченных в иммунный ответ и воспаление генов  
в патогенезе рака яичников (обзорная статья) .....3

#### Оригинальные исследования

Быканова М.А., Солодилова М.А., Бочарова А.В.,  
Вагайцева К.В., Степанов В.А., Полоников А.В.  
Промоторный полиморфизм rs890293 гена эпоксигеназы *CYP2J2*  
ассоциирован с повышенным риском развития  
гипертонической болезни у женщин .....12

Москалев А.С., Солдатов В.О., Вдовина И.Н.,  
Иванова Н.В., Иванов В.П., Полоников А.В., Бушуева О.Ю.  
Исследование взаимосвязи полиморфизмов  
I462V гена *CYP1A1* и -9-154C>A гена *CYP1A2*  
с риском развития колоректального рака  
у русских жителей Центральной России .....20

Забненкова В.В., Галева Н.М., Чухрова А.Л., Поляков А.В.  
Синдром врожденной центральной гиповентиляции:  
клинические особенности, молекулярно-генетические причины,  
ДНК-диагностика .....24

Баканова М.Л., Соболева О.А., Минина В.И.,  
Савченко Я.А., Рыжкова А.В., Титов Р.А., Титов В.А.,  
Боярских У.А., Воронина Е.Н., Глушков А.Н.  
Вклад полиморфных вариантов генов фолатного цикла  
в цитогенетическую нестабильность клеток крови  
больных раком легкого .....30

Швецов Я.Д., Лазарев К.Ю., Бушуева О.Ю.,  
Брайко О.П., Голубцов В.И., Полоников А.В.  
Протективный эффект полиморфизма R187S гена НАД(Ф)Н-хинон  
оксидоредуктазы типа 1 (*NQO1*) в развитии врожденных дефектов  
межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца .....33

Назаров В.Д., Лапин С.В., Гавриченко А.В., Хуторов Д.В., Лобачевская Т.В., Хальчицкий С.Е., Брачунов С.П., Красаков И.В., Виссарионов С.В., Баиндурашвили А.Г., Эмануэль В.Л., Тотолян А.А. Выявление экспансии тринуклеотидных повторов при болезни Гентингтона .....37

Литвякова Е.И., Бушуева О.Ю., Фролова О.Г., Полоников А.В. Исследование ассоциации полиморфизма -1293G>C (rs3813867) гена *CYP2E1* с риском развития рака желудка у жителей Центрального Черноземья .....41

Стецкая Т.А., Полоников А.В., Солдатов В.О., Бирюков А.Е., Ласков В.Б., Иванов В.П., Бушуева О.Ю. Полиморфизм +1675G>A гена *AGTR2* ассоциирован с развитием ишемического инсульта .....46

**Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №4 (178)**

**Научные обзоры**

Харченко А.В., Полоников А.В. Генетический контроль эпоксигеназного пути метаболизма эпоксиэйкозатриеновых кислот и развитие сердечно-сосудистых заболеваний .....3

Руденко В.В., Танас А.С., Попа А.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Эпигенетика острого миелоидного лейкоза у детей и взрослых ....9

**Оригинальные исследования**

Щагина О.А., Поляков А.В. К вопросу о преконцепционной профилактике наследственных болезней: случай выявления носительства редкой мутации у донора яйцеклеток и реципиентов .....19

Ельчинова Г.И., Макаев А.Х.-М., Биканов Р.А., Кадышев В.В., Петрин А.Н., Марахонов А.В., Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Популяционно-генетическая характеристика Урупского и Зеленчукского районов Республики Карачаево-Черкесия .....24

Азарова Ю.Э., Конопля А.И., Полоников А.В. Полиморфизм генов глутатион S-трансфераз и предрасположенность к сахарному диабету 2 типа у жителей Центрального Черноземья .....29

Самгина Т.А., Бушуева О.Ю., Канищев Ю.В., Григорьев С.Н., Назаренко П.М., Полоников А.В. Вклад полиморфизма (rs55754655) гена альдегидоксидазы в развитие острого панкреатита .....35

Захарян Р.В., Телумян Е.Г., Геворкян А.П., Аракелян А.А. Отсутствие ассоциации полиморфизма rs6339 гена нейротрофинового рецептора тирозинкиназы типа 1 с шизофренией в армянской популяции .....40

**Краткое сообщение**

Ельчинова Г.И., Макаев А.Х.-М., Биканов Р.А., Гаврилина С.Г., Петрин А.Н., Марахонов А.В., Ревазова Ю.А., Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Временная динамика случайного инбридинга, оцененного изонимным методом по базе данных ОМС в трех поколениях сельских церкесов .....44

**Памяти ученых**

Памяти профессора П.В. Новикова .....47

**Информация**

Правила оформления статей в журнале «Медицинская генетика» .....48

**Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №5 (179)**

Обращение главного редактора .....3

**Научные обзоры**

Баранов В.С. Эволюция предиктивной медицины. Старые идеи, новые понятия .....4

Маретина М.А., Киселев А.В., Баранов В.С. Возможные генетические модификаторы спинальной мышечной атрофии .....10

Тихонов А.В., Ефимова О.А., Пендина А.А., Баранов В.С. Эпигенетическое репрограммирование ДНК в гаметах и доимплантационных эмбрионах человека .....17

Никитина Д.И., Маретина М.А., Егорова А.А., Масленников А.Б., Киселев А.В. Использование высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК в диагностике наследственных заболеваний .....26

**Клинические случаи**

Пендина А.А., Ефимова О.А., Чиряева О.Г., Малышева О.В., Дудкина В.С., Петрова Л.И., Павлова П.А., Тихонов А.В., Крапивин М.И., Кольцова А.С., Парфеньев С.Е., Серебрякова Е.А., Шабанова Е.С. Случай генетического дисбаланса по коротким плечам хромосом 8 и 18 у пациентки без выраженных аномалий физического и умственного развития .....34

Осиновская Н.С., Султанов И.Ю. Идентификации двух мутаций в транс-положении в гене *CYP21A2* у плода без врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН). Случай пренатальной диагностики .....39

**Оригинальные исследования**

Третьякова Т.Б., Демченко Н.С., Рукосуев Н.Е. Полиморфизм генов фолатного цикла у женщин Уральского региона в норме и с привычным невынашиванием беременности .....42

Чуманова О.В., Пасман Н.М., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. Оценка роли полиморфизма генов системы гемостаза и генов, отвечающих за формирование дисфункции эндотелия, в развитии гестационных осложнений .....48

**Информация**

2-я Всероссийская научно-практическая конференция «Новые технологии диагностики наследственных болезней». Информационное письмо .....52

**Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №6 (180)**

**Научные обзоры**

Боброва О.П., Шнайдер Н.А., Зырянов С.К., Модестов А.А. Ассоциация полиморфизма гена опиоидных рецепторов *OPRM1* с фенотипическим разнообразием хронического болевого синдрома онкологического генеза .....3

**Оригинальные исследования**

Султанова Р.И., Хусаинова Р.И., Лебедева Е.Р., Бусыгина А.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов rs2289263 и rs6494629 гена *SMAD3* с интракраниальными аневризмами .....9

Исакова Ж.Т., Кипень В.Н., Семетей кызы Айгул, Талайбекова Э.Т., Макимбетов Э.К., Алдашева Н.М. Молекулярно-гистологическая характеристика опухолей молочной железы у женщин из кыргызской популяции – вклад генов *TP53*, *XRCC1* и *MDM2* .....21

Байдакова Г.В., Иванова Т.А., Раджабова Г.М., Сайдаева Д.Х., Джудинова Л.Л., Ахлакова А.И., Гамзатова А.И., Меликян Л.П., Бычков И.О., Михайлова С.В., Захарова Е.Ю. Особенности спектра мутаций при наследственной тирозинемии I типа в различных популяциях Российской Федерации .....29

Маркова Е.В., Татару Д.А. STR-маркеры хромосом, несущих мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb) гена *CFTR* .....36

Лобов С.Л., Хасанова Р.Р., Загидуллина А.Ш., Зайдуллин И.С., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К. Анализ мутаций в гене *CYP1B1* у пациентов с первичной врожденной и первичной открытоугольной глаукомой .....43

#### Поздравляем!

Людмила Павловна Назаренко .....48

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №7 (181)

#### Обращение главного редактора

О Руководстве по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) .....3

#### Организационно-методические аспекты

Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Маслеников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) .....4

#### Научные обзоры

Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Поляков А.В. Молекулярный патогенез болезни Вильсона-Коновалова .....18

#### Оригинальные исследования

Зинченко Р.А., Кадышев В.В., Макаев А.Х.-М., Галкина В.А., Дадали Е.Л., Хлебникова О.В., Михайлова Л.К., Марахонов А.В., Васильева Т.А., Петрова Н.В., Петрина Н.Е., Гундорова П., Танас А.С., Стрельников В.В., Поляков А.В., Гинтер Е.К. Разнообразие наследственных болезней у карацевцев Карачаево-Черкесской Республики .....25

#### Клинические случаи

Пичкур Н.А., Ольхович Н.В., Трофимова Н.С. Наследственные нарушения обмена тетрагидробиоптерина: особенности клинических проявлений и диагностика .....36

Дадали Е.Л., Акимова И.А., Коновалов Ф.А., Амплеева М.А., Шагина О.А. Описание клинического случая синдрома Николаидес–Барайцера, обусловленного мутациями в гене *SMARCA2* .....42

#### Поздравляем!

К 70-летию Валерия Павловича Пузырёва .....47

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №8 (182)

#### Научные обзоры

Баранова Е.Е., Беленикин М.С., Жученко Л.А., Ижевская В.Л. Неинвазивные пренатальные тесты: европейские и американские рекомендации по применению в клинической практике .....3

#### Оригинальные исследования

Дегтерева Е.В., Амелина С.С., Ветрова Н.В., Пономарева Т.И., Амелина М.А., Зинченко Р.А. Груз наследственных заболеваний кожи у населения 12 районов в Ростовской области .....11

Амелина С.С., Дегтерева Е.В., Амелина М.А., Ветрова Н.В., Пономарева Т.И., Зинченко Р.А. Нозологический спектр генодерматозов в 12 районах Ростовской области и популяциях европейской части России .....20

Новоселова О.Г., Петрова Н.В., Чакова Н.Н., Кондратьева Е.И., Воловик Н.О., Биканов Р.А., Бобровнический В.И., Зинченко Р.А. Изучение полиморфных вариантов генов 1 фазы биотрансформации ксенобиотиков у детей и подростков из г.Москвы и г.Минска .....27

Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарёв Б.С., Витковский Ю.А. Полиморфизм промотора гена *IL1B* (*G1473C*) и его влияние на содержание интерлейкина 1 в крови больных розеой .....32

#### Клинические случаи

Антоненко В.Г., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В., Глазкова А.В., Цяюк Ю.В., Петрова О.В. Редкий случай перестройки длинного плеча X-хромосомы – инвертированная дупликация/делеция у женщины с дисгенезией гонад .....36

Карамышева Т.В., Гайнер Т.А., Каримова О.Г., Богомолов А.Г., Рубцов Н.Б. Анализ необычной морфологии хромосомы 21 хориона при неразвивающейся беременности .....41

Матющенко Г.Н., Анисимова И.В. Описание клинического случая синдрома X-сцепленной умственной отсталости 102 типа, обусловленного мутацией в гене *DDX3X* .....46

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №9 (183)

#### Научные обзоры

Хлебникова О.В., Дадали Е.Л. Клинико-генетическая характеристика наследственных заболеваний и синдромов с глаукомой .....3

#### Оригинальные исследования

Жученко Л.А., Голошубов П.А., Ижевская В.Л. Анализ причин отказов беременных с высоким риском хромосомной патологии у плода от инвазивной пренатальной диагностики .....10

Ларионов А.В., Соболева О.А., Минина В.И., Тимофеева А.А., Головина Т.А., Дружинин В.Г. Исследование ассоциаций полиморфных вариантов генов *MnSOD*, *GPx* и *TP53* с частотами хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека при длительном воздействии радона .....16

Новикова Е.И., Снигирева Г.П., Солодкий В.А.  
Редкие мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*  
у российских больных раком молочной железы .....25

Щагина О.А., Миронович О.Л., Забненкова В.В.,  
Галеева Н.М., Близнец Е.А., Чухрова А.Л., Поляков А.В.  
Экспансия CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR*  
у больных спинальной амиотрофией.....31

**Клинические случаи**

Руденская Г.Е., Близнец Е.А., Демина Н.А.,  
Хлебникова О.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В.  
Клинико-молекулярно-генетические характеристики  
глазо-зубо-пальцевого синдрома.....37

Акимова И.А., Дадали Е.Л., Коростелев С.А.,  
Хмелькова Д.Н., Коновалов Ф.А.  
Случай синдрома KBG, обусловленного  
ранее не описанной мутацией в гене *ANKRD11* .....48

**Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №10 (184)**

**Научные обзоры**

Захарова Е.Ю., Ижевская В.Л., Байдакова Г.В.,  
Иванова Т.А., Чумакова О.В., Куцев С.И.  
Массовый скрининг на наследственные болезни:  
ключевые вопросы .....3

**Оригинальные исследования**

Святова Г.С., Салимбаева Д.Н.,  
Кирибаева М.С., Березина Г.М.  
10 лет неонатальному скринингу в Республике Казахстан:  
итоги и перспективы .....14

Чурюмова Ю.А., Вохмянина Н.В.  
Использование новых технологий диагностики  
для выявления наследственных болезней обмена .....18

Еремина Е.Р.  
Анализ региональных частот наследственных болезней обмена,  
выявляемых по неонатальному скринингу  
в Республике Бурятия .....23

Голубенко М.В., Тарасенко Н.В., Макеева О.А.,  
Гончарова И.А., Марков А.В., Слепцов А.А., Комар А.А.,  
Назаренко М.С., Барбараш О.Л., Пузырев В.П.  
Полиморфизм мтДНК при клинически выраженном каротидном  
атеросклерозе: протективный эффект гаплогруппы J .....26

Сигин В.О., Кузнецова Е.Б., Симонова О.А.,  
Жевлова А.И., Литвяков Н.В., Слонимская Е.М.,  
Цыганов М.М., Володин И.В., Шикеева А.А.,  
Стрельников В.В., Залетаев Д.В., Танас А.С.  
Медицинская ДНК-технология оценки чувствительности  
опухолей молочной железы люминального В подтипа  
к неоадьювантной химиотерапии с применением антрациклинов  
на основе маркеров метилирования ДНК.....29

Симонова О.А., Кузнецова Е.Б., Танас А.С.,  
Руденко В.В., Поддубская Е.В., Кекеева Т.В.,  
Керимов Р.А., Троценко И.Д., Пашенко М.С.,  
Алексеева Е.А., Залетаев Д.В., Стрельников В.В.  
Метилирование генов матриксных металлопротеиназ  
и их ингибиторов в норме и при раке молочной железы .....36

Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М.,  
Ушакова Т.Л., Саакян С.В., Танас А.С., Немцова М.В.,  
Стрельников В.В., Залетаев Д.В.  
Результаты использования новой медицинской технологии  
комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы .....41

**Клинические случаи**

Слепухина А.А., Скрябин Н.А., Кашеварова А.А.,  
Новикова М.А., Лифшиц Г.И., Лебедев И.Н.  
Редкие вариации числа копий ДНК:  
микродупликация 20p13 материнского происхождения у пациента  
с комплексным пороком сердца и аномалией бронхов .....47

Лязина Л.В., Бодюль Н.Н., Вохмянина Н.В.,  
Ефимова А.Г., Серебрякова Е.А., Иващенко Т.Э.,  
Глотов О.С., Глотов А.С., Романова О.В.,  
Куранова М.Л., Василишина А.А., Суспицын Е.Н.,  
Михайлов А.В., Сарана А.М., Щербак С.Г., Баранов В.С.  
Возможности оказания медицинской помощи  
в современных условиях  
на примере семьи с наследственной патологией.....51

**Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №11 (185)**

**Научные обзоры**

Твеленёва А.А., Мусатова Е.В., Шилова Н.В.  
Методы полногеномной амплификации  
генетического материала единичных клеток .....3

**Оригинальные исследования**

Филиппов О.С., Андреева Е.Н., Голошубов П.А.,  
Калашникова Е.А., Одегова Н.О., Жученко Л.А.  
Современный пренатальный скрининг  
на врожденные пороки развития и хромосомные аномалии  
в Российской Федерации. Результаты Аудита-2017.....7

Жикривецкая С.О., Орлова А.А., Мусатова Е.В.,  
Софронова Я.В., Померанцева Е.А.  
Преимплантационная генетическая диагностика дупликации  
в районе 17p11.2 при синдроме Шарко-Мари-Тута типа 1 .....11

Щагина О.А., Полякова Д.А., Рыжкова О.П., Булах М.В.,  
Забненкова В.В., Логинова А.Н., Поляков А.В.  
Причины мышечной дистрофии  
у женщин с направляющим диагнозом  
«мышечная дистрофия Дюшена/Беккера» .....17

Марахонов А.В., Васильева Т.А., Воскресенская А.А.,  
Кадышев В.В., Поздеева Н.А., Шилова Н.В., Браславская С.И.,  
Хлебникова О.В., Зинченко Р.А., Куцев С.И.  
Опыт применения медицинской технологии диагностики  
врожденной аниридии в ФГБНУ «МГНЦ» .....23

Бабушкина Н.П., Гончарова И.А., Голубенко М.В.  
Разработка технологии диагностики  
наследственных генетических вариантов,  
определяющих чувствительность к варфарину,  
методом однонуклеотидного удлинения праймеров.....27

Смирнихина С.А., Банников А.В., Анучина А.А.,  
Кочергин-Никитский К.С., Адильгереева Э.П., Лавров А.В.  
Факторы, влияющие на эффективность CRISPR/Cas9  
для коррекции мутации F508del при муковисцидозе .....32

**Клинические случаи**

Руденская Г.Е., Шумарина А.О., Антонев А.В.,  
Сермягина И.Г., Крылова Т.Д., Щагина О.А.  
Случай сочетания двух редких неврологических болезней,  
выявленных панельным экзомным секвенированием .....38

Кожанова Т.В., Жилина С.С., Мещерякова Т.И.,  
Прокопьева Н.П., Осипова К.В., Айвазян С.О.,  
Канивец И.В., Коновалов Ф.А.,  
Толмачева Е.Р., Кошкин Ф.А., Притыко А.Г.  
Х-сцепленная умственная отсталость (тип Кантаргеля) у девочки:  
клинический случай из практики .....42

Кашеварова А.А., Беляева Е.О., Никонов А.М.,  
Плотникова О.В., Гергерт И.Г., Никитина Т.В.,  
Скрябин Н.А., Васильев С.А., Лопаткина М.Е.,  
Чурилова А.В., Толмачева Е.Н.,  
Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.

Интерпретация фенотипа пациента с учетом результатов  
комплексных молекулярно-цитогенетических исследований.....46

### Медицинская генетика. — 2017. — Т. 16, №12 (186)

Обращение главного редактора.....3

#### Научные обзоры

Назаренко М.С., Слепцов А.А., Марков А.В., Пузырев В.П.  
Вариабельность генома соматических клеток  
при многофакторных заболеваниях человека.....4

#### Оригинальные исследования

Гайнер Т.А., Карамышева Т.В., Каримова О.Г.,  
Корень О.Л., Шлома В.В., Шорина А.Р.,  
Богомолов А.Г., Рубцов Н.Б.  
Комплексная диагностика хромосомной патологии —  
дериивата хромосомы 4  
и малой сверхчисленной маркерной хромосомы .....9

Кашеварова А.А., Беляева Е.О., Никонов А.М.,  
Плотникова О.В., Гергерт И.Г., Никитина Т.В.,  
Скрябин Н.А., Мензоров А.Г., Гридина М.М.,  
Васильев С.А., Лопаткина М.Е., Савченко Р.Р.,  
Чурилова А.В., Толмачева Е.Н., Серов О.Л.,  
Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.  
Спонтанная хромосомная нестабильность в клетках  
с кольцевой хромосомой как основа хромосомной терапии .....18

Скрябин Н.А., Васильев С.А., Толмачева Е.Н.,  
Шорина А.Р., Савченко Р.Р.,  
Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.  
Паттерн метилирования ДНК в участках генома  
с наследуемыми CNV .....27

Харьков В.Н., Колесников Н.А., Раджабов М.О.,  
Хитринская И.Ю., Степанов В.А.  
Генофонд коренных народов Дагестана андийской группы  
по аутосомным STR-маркерам .....31

Харьков В.Н., Новикова Л.М., Штыгашева О.В.,  
Агеева Е.С., Волков В.Г.,  
Хитринская И.Ю., Степанов В.А.  
Анализ родоплеменной структуры хакасов  
по маркерам Y-хромосомы.....35

Беляева Е.О., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А.,  
Лопаткина М.Е., Салюкова О.А., Филимонова М.Н.,  
Лежнина О.В., Шорина А.Р., Масленников А.Б.,  
Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.  
Частота и спектр хромосомных микродупликаций  
у пациентов с нарушениями умственного развития.....39

Маркова Ж.Г., Миньженкова М.В., Тарлычева А.А.,  
Цветкова Т.Г., Галкина В.А., Шилова Н.В.  
Фенотипическая вариабельность  
у пациентов с *de novo* X-аутосомными  
несбалансированными транслокациями.....43

#### Поздравляем!

К 90-летию Доры Клавдиевны Верлинской .....48

#### Информация

Содержание  
журнала «Медицинская генетика» в 2017 г. ....49

Алфавитный указатель  
авторов журнала «Медицинская генетика» в 2017 г. ....54

# Алфавитный указатель авторов журнала «Медицинская генетика в 2017 г.

Авакян Л.В. . . . .	№1: С. 37	Бобровничей В.И. . . . .	№8: С. 27	Глотов О.С. . . . .	№10: С. 51
Агеева Е.С. . . . .	№12: С. 35	Богомолов А.Г. . . . .	№8: С. 41	Глушков А.Н. . . . .	№3: С. 30
Адильгереева Э.П. . . . .	№11: С. 32	. . . . .	№12: С. 9	Головина Т.А. . . . .	№9: С. 16
Азарова Ю.Э. . . . .	№4: С. 29	Бодюль Н.Н. . . . .	№10: С. 51	Голошубов П.А. . . . .	№9: С. 10
Айвазян С.О. . . . .	№11: С. 42	Бочарова А.В. . . . .	№3: С. 12	. . . . .	№11: С. 7
Акимова И.А. . . . .	№7: С. 42	Боярских У.А. . . . .	№3: С. 30	Голубенко М.В. . . . .	№7: С. 4
. . . . .	№9: С. 48	Брагина Е.Ю. . . . .	№1: С. 20	. . . . .	№10: С. 26
Алдашева Н.М. . . . .	№6: С. 21	Брайко О.П. . . . .	№3: С. 33	. . . . .	№11: С. 27
Алексеева Е.А. . . . .	№10: С. 36, 41	Браславская С.И. . . . .	№11: С. 23	Голубцов В.И. . . . .	№3: С. 33
Алексеева Н.В. . . . .	№1: С. 31	Брачунов С.П. . . . .	№3: С. 37	Гончарова И.А. . . . .	№10: С. 26
Алешкин В.А. . . . .	№1: С. 37	Бровин Д.Л. . . . .	№2: С. 26	. . . . .	№11: С. 27
Амелина Е.Л. . . . .	№1: С. 37	Букина А.М. . . . .	№1: С. 37	Григорьев С.Н. . . . .	№4: С. 35
Амелина М.А. . . . .	№8: С. 11, 20	Булах М.В. . . . .	№11: С. 17	Гридина М.М. . . . .	№12: С. 18
Амелина С.С. . . . .	№8: С. 11, 20	Бусыгина А.В. . . . .	№6: С. 9	Гундорова П. . . . .	№7: С. 25
Амплеева М.А. . . . .	№7: С. 42	Бушуева О.Ю. . . . .	№2: С. 37	Дадали Е.Л. . . . .	№7: С. 25, 42
Андреева Е.Н. . . . .	№11: С. 7	. . . . .	№3: С. 20, 33, 41, 46	. . . . .	№9: С. 3, 37, 48
Анисимова И.В. . . . .	№8: С. 46	. . . . .	№4: С. 35	Дегтерева Е.В. . . . .	№8: С. 11, 20
Антоненко В.Г. . . . .	№8: С. 36	Быканова М.А. . . . .	№3: С. 12	Демина Н.А. . . . .	№9: С. 37
Антонец А.В. . . . .	№11: С. 38	Бычков И.О. . . . .	№2: С. 30	Демченко Н.С. . . . .	№5: С. 42
Анучина А.А. . . . .	№11: С. 32	. . . . .	№6: С. 29	Дерюшева И.В. . . . .	№1: С. 25
Аракелян А.А. . . . .	№4: С. 40	Бычковская Л.С. . . . .	№1: С. 31	Джемилаева Л.У. . . . .	№6: С. 48
Асанов А.Ю. . . . .	№1: С. 31	Вагайцева К.В. . . . .	№3: С. 12	Джудинова Л.Л. . . . .	№6: С. 29
Афанасьев А.А. . . . .	№7: С. 4	Василишина А.А. . . . .	№10: С. 51	Дмитренко Д.В. . . . .	№1: С. 3
Ахлакова А.И. . . . .	№6: С. 29	Васильев С.А. . . . .	№11: С. 46	Дружинин В.Г. . . . .	№9: С. 16
Бабенко О.В. . . . .	№10: С. 41	. . . . .	№12: С. 18, 27	Дудкина В.С. . . . .	№5: С. 34
Бабушкина Н.П. . . . .	№1: С. 20	Васильева Т.А. . . . .	№2: С. 19	Дьякова С.Э. . . . .	№2: С. 40
. . . . .	№11: С. 27	. . . . .	№7: С. 25	Егорова А.А. . . . .	№5: С. 26
Баженова Е.А. . . . .	№2: С. 26	. . . . .	№11: С. 23	Ельчинова Г.И. . . . .	№4: С. 24, 44
Баиндурашвили А.Г. . . . .	№3: С. 37	Вдовина И.Н. . . . .	№3: С. 20	Емельянов А.С. . . . .	№8: С. 32
Байдакова Г.В. . . . .	№6: С. 29	Ветрова Н.В. . . . .	№8: С. 11, 20	Емельянова А.Н. . . . .	№8: С. 32
. . . . .	№10: С. 3	Виссарионов С.В. . . . .	№3: С. 37	Еремина Е.Р. . . . .	№10: С. 23
Баканова М.Л. . . . .	№3: С. 30	Витковский Ю.А. . . . .	№8: С. 32	Ефимова А.Г. . . . .	№10: С. 51
Балинова Н.В. . . . .	№1: С. 31	Волков В.Г. . . . .	№12: С. 35	Ефимова О.А. . . . .	№5: С. 17, 34
Банников А.В. . . . .	№11: С. 32	Воловик Н.О. . . . .	№8: С. 27	Жалсанова И.Ж. . . . .	№1: С. 20
Баранов В.С. . . . .	№5: С. 10, 17	Володин И.В. . . . .	№10: С. 29	Жевлова А.И. . . . .	№10: С. 29
. . . . .	№10: С. 51	Воронина Е.Н. . . . .	№3: С. 30	Жикривецкая С.О. . . . .	№11: С. 11
Баранов В.С. . . . .	№5: С. 3	. . . . .	№5: С. 48	Жилина С.С. . . . .	№11: С. 42
Баранова Е.Е. . . . .	№8: С. 3	Воскресенская А.А. . . . .	№11: С. 23	Жученко Л.А. . . . .	№8: С. 3
Баранова Е.И. . . . .	№2: С. 26	Вохмянина Н.В. . . . .	№10: С. 18, 51	. . . . .	№9: С. 10
Барбараш О.Л. . . . .	№10: С. 26	Гаврилина С.Г. . . . .	№4: С. 44	. . . . .	№11: С. 7
Барышева Е.М. . . . .	№2: С. 37	Гавриченко А.В. . . . .	№3: С. 37	Забненкова В.В. . . . .	№3: С. 24
Батожаргалова Б.Ц. . . . .	№2: С. 40	Гайнер Т.А. . . . .	№8: С. 41	. . . . .	№9: С. 31
Баязутдинова Г.М. . . . .	№7: С. 18	. . . . .	№12: С. 9	. . . . .	№11: С. 17
Беленикин М.С. . . . .	№8: С. 3	Галеева Н.М. . . . .	№3: С. 24	Загидуллина А.Ш. . . . .	№6: С. 48
Беляева Е.О. . . . .	№11: С. 46	. . . . .	№9: С. 31	Зайдуллин И.С. . . . .	№6: С. 48
. . . . .	№12: С. 18, 39	Галкина В.А. . . . .	№7: С. 25	Заклязьминская Е.В. . . . .	№7: С. 4
Беляева О.Д. . . . .	№2: С. 26	. . . . .	№12: С. 43	Залетаев Д.В. . . . .	№4: С. 9
Березина Г.М. . . . .	№10: С. 14	Гамзатова А.И. . . . .	№6: С. 29	. . . . .	№10: С. 29, 36, 41
Беркович О.А. . . . .	№2: С. 26	Гараева А.Ф. . . . .	№1: С. 20	Захарова Е.Ю. . . . .	№2: С. 30
Бец Л.В. . . . .	№1: С. 31	Геворкян А.П. . . . .	№4: С. 40	. . . . .	№6: С. 29
Биканов Р.А. . . . .	№4: С. 24, 44	Гергерт И.Г. . . . .	№11: С. 46	. . . . .	№10: С. 3
. . . . .	№8: С. 27	. . . . .	№12: С. 18	Захарян Р.В. . . . .	№4: С. 40
Бирюков А.Е. . . . .	№3: С. 46	Гинтер Е.К. . . . .	№2: С. 19	Зинченко Р.А. . . . .	№2: С. 19, 40
Близнец Е.А. . . . .	№2: С. 19	. . . . .	№4: С. 24, 44	. . . . .	№4: С. 24, 44
. . . . .	№9: С. 31, 37	. . . . .	№7: С. 25	. . . . .	№7: С. 25
Боброва О.П. . . . .	№1: С. 3	Глазкова А.В. . . . .	№8: С. 36	. . . . .	№8: С. 11, 20, 27
. . . . .	№6: С. 3	Глотов А.С. . . . .	№10: С. 51	. . . . .	№11: С. 23

Зотина Е.И. . . . .	№2: С. 30	. . . . .	№11: С. 23	. . . . .	№10: С. 26
Зырянов С.К. . . . .	№6: С. 3	Лавров А.В. . . . .	№11: С. 32	. . . . .	№12: С. 4
Ибрагимова М.К. . . . .	№1: С. 25	Лазарев К.Ю. . . . .	№3: С. 33	Назаров В.Д. . . . .	№3: С. 37
Иванов В.П. . . . .	№3: С. 20, 46	Лапин С.В. . . . .	№3: С. 37	Немцова М.В. . . . .	№10: С. 41
Иванова Н.В. . . . .	№2: С. 37	Ларионов А.В. . . . .	№9: С. 16	Никитин В.В. . . . .	№2: С. 30
. . . . .	№3: С. 20	Ласков В.Б. . . . .	№3: С. 46	Никитина Д.И. . . . .	№5: С. 26
Иванова Т.А. . . . .	№6: С. 29	Лебедев И.Н. . . . .	№10: С. 47	Никитина Т.В. . . . .	№11: С. 46
. . . . .	№10: С. 3	. . . . .	№11: С. 46	. . . . .	№12: С. 18
Иващенко Т.Э. . . . .	№10: С. 51	. . . . .	№12: С. 18, 27, 39	Николаев М.А. . . . .	№2: С. 26
Ижевская В.Л. . . . .	№8: С. 3	Лебедева Е.Р. . . . .	№6: С. 9	Никонов А.М. . . . .	№11: С. 46
. . . . .	№9: С. 10	Лежнина О.В. . . . .	№12: С. 39	. . . . .	№12: С. 18
. . . . .	№10: С. 3	Литвяков Н.В. . . . .	№1: С. 25	Новикова Е.И. . . . .	№9: С. 25
Ильина Е.С. . . . .	№2: С. 30	. . . . .	№10: С. 29	Новикова Л.М. . . . .	№12: С. 35
Исакова Ж.Т. . . . .	№6: С. 21	Литвякова Е.И. . . . .	№3: С. 41	Новикова М.А. . . . .	№10: С. 47
Иткис Ю.С. . . . .	№2: С. 30	Лифшиц Г.И. . . . .	№10: С. 47	Новоселова О.Г. . . . .	№8: С. 27
Кадышев В.В. . . . .	№4: С. 24	Лобачевская Т.В. . . . .	№3: С. 37	Одегова Н.О. . . . .	№11: С. 7
. . . . .	№7: С. 25	Лобов С.Л. . . . .	№6: С. 48	Ольхович Н.В. . . . .	№7: С. 36
. . . . .	№11: С. 23	Логонова А.Н. . . . .	№11: С. 17	Орлова А.А. . . . .	№11: С. 11
Калашникова Е.А. . . . .	№11: С. 7	Лопаткина М.Е. . . . .	№11: С. 46	Осиновская Н.С. . . . .	№5: С. 39
Канивец И.В. . . . .	№11: С. 42	. . . . .	№12: С. 18, 39	Осипова К.В. . . . .	№11: С. 42
Канищев Ю.В. . . . .	№4: С. 35	Лязина Л.В. . . . .	№10: С. 51	Павлов А.Е. . . . .	№7: С. 4
Карамышева Т.В. . . . .	№8: С. 41	Макаов А.Х.-М. . . . .	№2: С. 19	Павлова П.А. . . . .	№5: С. 34
. . . . .	№12: С. 9	. . . . .	№4: С. 24, 44	Пантелеева А.А. . . . .	№2: С. 26
Карапетян М.К. . . . .	№1: С. 31	. . . . .	№7: С. 25	Парфеньев С.Е. . . . .	№5: С. 34
Кардымон О.Л. . . . .	№7: С. 4	Макаров С.В. . . . .	№1: С. 31	Пасман Н.М. . . . .	№5: С. 48
Каримова О.Г. . . . .	№8: С. 41	Макеева О.А. . . . .	№10: С. 26	Пашченко М.С. . . . .	№10: С. 36
. . . . .	№12: С. 9	Макимбетов Э.К. . . . .	№6: С. 21	Пендина А.А. . . . .	№5: С. 17, 34
Кашеварова А.А. . . . .	№10: С. 47	Малышева О.В. . . . .	№5: С. 34	Петрин А.Н. . . . .	№2: С. 19
. . . . .	№11: С. 46	Марахонов А.В. . . . .	№4: С. 24, 44	. . . . .	№4: С. 24, 44
. . . . .	№12: С. 18, 27, 39	. . . . .	№7: С. 25	Петрина Н.Е. . . . .	№2: С. 19
Кекеева Т.В. . . . .	№10: С. 36	. . . . .	№11: С. 23	. . . . .	№7: С. 25
Керимов Р.А. . . . .	№10: С. 36	Маретина М.А. . . . .	№5: С. 10, 26	Петрова Л.И. . . . .	№5: С. 34
Кипень В.Н. . . . .	№6: С. 21	Марков А.В. . . . .	№10: С. 26	Петрова М.М. . . . .	№1: С. 3
Кирикбаева М.С. . . . .	№10: С. 14	. . . . .	№12: С. 4	Петрова Н.В. . . . .	№2: С. 19, 40
Киселев А.В. . . . .	№5: С. 10, 26	Маркова Е.В. . . . .	№1: С. 11	. . . . .	№7: С. 25
Кожанова Т.В. . . . .	№11: С. 42	. . . . .	№6: С. 36	. . . . .	№8: С. 27
Козлова В.М. . . . .	№10: С. 41	Маркова Ж.Г. . . . .	№8: С. 36	Петрова О.В. . . . .	№8: С. 36
Колесников Н.А. . . . .	№12: С. 31	. . . . .	№12: С. 43	Пикунев Д.Ю. . . . .	№2: С. 11
Колоколова О.В. . . . .	№1: С. 20	Масленников А.Б. . . . .	№5: С. 26	Пичкур Н.А. . . . .	№2: С. 30
Колпакчи Л.М. . . . .	№2: С. 30	. . . . .	№7: С. 4	. . . . .	№7: С. 36
Кольцова А.С. . . . .	№5: С. 34	. . . . .	№12: С. 39	Плотникова О.В. . . . .	№11: С. 46
Комар А.А. . . . .	№10: С. 26	Матющенко Г.Н. . . . .	№8: С. 46	. . . . .	№12: С. 18
Кондратьева Е.И. . . . .	№8: С. 27	Меликян Л.П. . . . .	№6: С. 29	Поддубская Е.В. . . . .	№10: С. 36
Коновалов Ф.А. . . . .	№7: С. 4, 42	Мензоров А.Г. . . . .	№12: С. 18	Поздеева Н.А. . . . .	№11: С. 23
. . . . .	№9: С. 48	Мещерякова Т.И. . . . .	№11: С. 42	Полоников А.В. . . . .	№2: С. 37
. . . . .	№11: С. 42	Мизерницкий Ю.Л. . . . .	№2: С. 40	. . . . .	№3: С. 12, 20, 33, 41, 46
Конопля А.И. . . . .	№4: С. 29	Мингажева Э.Т. . . . .	№3: С. 3	. . . . .	№4: С. 3, 29, 35
Копытова А.Э. . . . .	№2: С. 26	Минина В.И. . . . .	№3: С. 30	Полшведкина О.Б. . . . .	№2: С. 37
Корень О.Л. . . . .	№12: С. 9	. . . . .	№9: С. 16	Поляков А.В. . . . .	№2: С. 11, 19
Коростелев С.А. . . . .	№9: С. 48	Миньженкова М.В. . . . .	№12: С. 43	. . . . .	№3: С. 24
Костарева А.А. . . . .	№7: С. 4	Миронович О.Л. . . . .	№9: С. 31	. . . . .	№4: С. 19
Кочергин-Никитский К.С. . . . .	№11: С. 32	Мирошникова В.В. . . . .	№2: С. 26	. . . . .	№7: С. 4, 18, 25
Кошкин Ф.А. . . . .	№11: С. 42	Михайлов А.В. . . . .	№10: С. 51	. . . . .	№9: С. 31, 37
Крапивин М.И. . . . .	№5: С. 34	Михайлова Л.К. . . . .	№7: С. 25	. . . . .	№11: С. 17
Красаков И.В. . . . .	№3: С. 37	Михайлова С.В. . . . .	№2: С. 30	Полякова Д.А. . . . .	№11: С. 17
Красовский С.А. . . . .	№1: С. 37	. . . . .	№6: С. 29	Померанцева Е.А. . . . .	№11: С. 11
Крылова Т.Д. . . . .	№11: С. 38	Модестов А.А. . . . .	№6: С. 3	Пономарева Т.И. . . . .	№8: С. 11, 20
Кудрявцева О.К. . . . .	№2: С. 37	Москалев А.С. . . . .	№3: С. 20	Попа А.В. . . . .	№4: С. 9
Кузнецова Е.Б. . . . .	№10: С. 29, 36	Мусатова Е.В. . . . .	№11: С. 3, 11	Преда О.Г. . . . .	№1: С. 11
Куранова М.Л. . . . .	№10: С. 51	Назаренко Л.П. . . . .	№11: С. 46	Притыко А.Г. . . . .	№11: С. 42
Куцев С.И. . . . .	№7: С. 4	. . . . .	№12: С. 18, 39	Прокопьева Н.П. . . . .	№11: С. 42
. . . . .	№10: С. 3	Назаренко М.С. . . . .	№4: С. 35	Прокофьева Д.С. . . . .	№3: С. 3

Пронина Е.А. . . . .	№1: С. 3	Соболева О.А. . . . .	№3: С. 30	Харченко А.В. . . . .	№4: С. 3
Прохорчук Е.Б. . . . .	№7: С. 4	. . . . .	№9: С. 16	Харьков В.Н. . . . .	№12: С. 31, 35
Пузырев В.П. . . . .	№1: С. 20	Солдатов В.О. . . . .	№3: С. 20, 46	Хасанова Р.Р. . . . .	№6: С. 48
. . . . .	№10: С. 26	Солодилова М.А. . . . .	№3: С. 12	Хитринская И.Ю. . . . .	№12: С. 31, 35
. . . . .	№12: С. 4	Солодкий В.А. . . . .	№9: С. 25	Хлебникова О.В. . . . .	№7: С. 25
Пухальская Д.А. . . . .	№1: С. 37	Сорокина М.В. . . . .	№2: С. 37	. . . . .	№9: С. 3, 37
Пушкарев Б.С. . . . .	№8: С. 32	Софронова Я.В. . . . .	№11: С. 11	. . . . .	№11: С. 23
Пчелина С.Н. . . . .	№2: С. 26	Спицын В.А. . . . .	№1: С. 31	Хмелькова Д.Н. . . . .	№9: С. 48
Раджабов М.О. . . . .	№12: С. 31	Спицына Н.Х. . . . .	№1: С. 31	Хусаинова Р.И. . . . .	№2: С. 3
Раджабова Г.М. . . . .	№6: С. 29	Степанов В.А. . . . .	№3: С. 12	. . . . .	№6: С. 9
Ревазова Ю.А. . . . .	№4: С. 44	. . . . .	№7: С. 4	Хуснутдинова Э.К. . . . .	№2: С. 3
Романова О.В. . . . .	№10: С. 51	. . . . .	№12: С. 31, С. 35	. . . . .	№3: С. 3
Рубцов Н.Б. . . . .	№8: С. 41	Стецкая Т.А. . . . .	№3: С. 46	. . . . .	№6: С. 9, 48
. . . . .	№12: С. 9	Стрельников В.В. . . . .	№4: С. 9	Хуторов Д.В. . . . .	№3: С. 37
Руденко В.В. . . . .	№4: С. 9	. . . . .	№7: С. 25	Цаюк Ю.В. . . . .	№8: С. 36
. . . . .	№10: С. 36	. . . . .	№10: С. 29, 36, 41	Цветкова Т.Г. . . . .	№12: С. 43
Руденская Г.Е. . . . .	№9: С. 37	Строганова М.В. . . . .	№1: С. 3	Цуканов А.С. . . . .	№2: С. 11
. . . . .	№11: С. 38	Султанов И.Ю. . . . .	№5: С. 39	Цыганкова П.Г. . . . .	№2: С. 30
Рукосуев Н.Е. . . . .	№8: С. 42	Султанова Р.И. . . . .	№6: С. 9	Цыганов М.М. . . . .	№1: С. 25
Рыжкова А.В. . . . .	№3: С. 30	Суспицын Е.Н. . . . .	№10: С. 51	. . . . .	№10: С. 29
Рыжкова О.П. . . . .	№7: С. 4	Танас А.С. . . . .	№4: С. 9	Чакова Н.Н. . . . .	№8: С. 27
. . . . .	№11: С. 17	. . . . .	№7: С. 25	Чиряева О.Г. . . . .	№5: С. 34
Саакян С.В. . . . .	№10: С. 41	. . . . .	№10: С. 29, 36, 41	Чудакова Л.В. . . . .	№2: С. 19
Савченко Р.Р. . . . .	№12: С. 18, 27	Тарасенко Н.В. . . . .	№10: С. 26	Чумакова О.В. . . . .	№10: С. 3
Савченко Я.А. . . . .	№3: С. 30	Тарлычева А.А. . . . .	№12: С. 43	Чуманова О.В. . . . .	№5: С. 48
Сайдаева Д.Х. . . . .	№6: С. 29	Татару Д.А. . . . .	№1: С. 11	Чурилова А.В. . . . .	№11: С. 46
Сакаева Д.Д. . . . .	№3: С. 3	. . . . .	№6: С. 36	. . . . .	№12: С. 18
Салимбаева Д.Н. . . . .	№10: С. 14	Твеленёва А.А. . . . .	№11: С. 3	Чурюмова Ю.А. . . . .	№10: С. 18
Салюкова О.А. . . . .	№12: С. 39	Телумян Е.Г. . . . .	№4: С. 40	Чухрова А.Л. . . . .	№3: С. 24
Самгина Т.А. . . . .	№4: С. 35	Тимофеева А.А. . . . .	№9: С. 16	. . . . .	№9: С. 31
Сарана А.М. . . . .	№10: С. 51	Титов В.А. . . . .	№3: С. 30	Шабанова Е.С. . . . .	№5: С. 34
Святова Г.С. . . . .	№10: С. 14	Титов Р.А. . . . .	№3: С. 30	Шаповалова Д.А. . . . .	№2: С. 3
Семенов Д.А. . . . .	№2: С. 11	Тихонов А.В. . . . .	№5: С. 17, 34	Швецов Я.Д. . . . .	№3: С. 33
Семенова И.А. . . . .	№2: С. 26	Толмачева Е.Н. . . . .	№11: С. 46	Шельгин Ю.А. . . . .	№2: С. 11
Семетей кызы Айгул . . . . .	№6: С. 21	. . . . .	№12: С. 18, 27	Шикеева А.А. . . . .	№10: С. 29
Талайбекова Э.Т. . . . .	№6: С. 21	Толмачева Е.Р. . . . .	№11: С. 42	Шилова Н.В. . . . .	№8: С. 36
Семькин С.Ю. . . . .	№1: С. 37	Тотолян А.А. . . . .	№3: С. 37	. . . . .	№11: С. 3, 23
Серебрякова Е.А. . . . .	№5: С. 34	Третьякова Т.Б. . . . .	№5: С. 42	. . . . .	№12: С. 43
. . . . .	№10: С. 51	Трофимова Н.С. . . . .	№7: С. 36	Шлома В.В. . . . .	№12: С. 9
Сермягина И.Г. . . . .	№11: С. 38	Троценко И.Д. . . . .	№10: С. 36	Шмарина Г.В. . . . .	№1: С. 37
Серов О.Л. . . . .	№12: С. 18	Тюрин А.В. . . . .	№2: С. 3	Шнайдер Н.А. . . . .	№1: С. 3
Сигин В.О. . . . .	№10: С. 29	Усачева М.Ю. . . . .	№1: С. 37	. . . . .	№6: С. 3
Симонова О.А. . . . .	№10: С. 29, 36	Усенко Т.С. . . . .	№2: С. 26	Шорина А.Р. . . . .	№12: С. 9, 27, 39
Скрябин Н.А. . . . .	№10: С. 47	Ушакова Т.Л. . . . .	№10: С. 41	Штыгашева О.В. . . . .	№12: С. 35
. . . . .	№11: С. 46	Фаисханова Р.Р. . . . .	№3: С. 3	Шумарина А.О. . . . .	№11: С. 38
. . . . .	№12: С. 18, С. 27, С. 39	Федонюк И.Д. . . . .	№2: С. 30	Щагина О.А. . . . .	№4: С. 19
Слепухина А.А. . . . .	№10: С. 47	Филимонова М.Н. . . . .	№12: С. 39	. . . . .	№7: С. 18, 42
Слепцов А.А. . . . .	№10: С. 26	Филипенко М.Л. . . . .	№5: С. 48	. . . . .	№9: С. 31
. . . . .	№12: С. 4	Филиппов О.С. . . . .	№11: С. 7	. . . . .	№11: С. 17, 38
Слонимская Е.М. . . . .	№10: С. 29	Фрейдин М.Б. . . . .	№1: С. 20	Щербак С.Г. . . . .	№10: С. 51
Смирнихина С.А. . . . .	№11: С. 32	Фролова О.Г. . . . .	№3: С. 41	Эмануэль В.Л. . . . .	№3: С. 37
Снигирева Г.П. . . . .	№9: С. 25	Хальчицкий С.Е. . . . .	№3: С. 37		