НИИ
МЕДИЦИНСКОЙ
ГЕНЕТИКИ
ТОМСКОГО НИМЦ

ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА И ПАТОЛОГИЯ

Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИЙ ГЕНЕТИКИ

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА И ПАТОЛОГИЯ
Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики

Сборник научных трудов

Выпуск 12

Издательство
Литературное бюро
Томск–2019

УДК 575:616-056.7(045)
БББ 52.54я5
Г 340

Редакционный совет:

Член-корр. РАН, д-р биол. наук, профессор **В.А. Степанов** (главный редактор),
академик РАН, д-р мед. наук, профессор **В.П. Пузырёв,**
д-р биол. наук, профессор **А.Н. Кучер** (ответственный редактор),
д-р биол. наук, профессор РАН **И.Н. Лебедев,**
д-р мед. наук, профессор **Л.П. Назаренко,**
д-р мед. наук **М.С. Назаренко,**
канд. биол. наук **И.Ю. Хитринская**

Г 340 **Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики:** сборник научных трудов / под. ред. В.А. Степанова. Вып. 12. – Томск: Литературное бюро, 2019. – 74 с.

ISBN 978-5-990805-11-8

Сборник научных трудов приурочен к проведению XII научной конференции «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (г. Томск, 20–22 ноября 2019 г.), посвященной памяти член-корр. РАМН, д-ра биол. наук, профессора Сергея Андреевича Назаренко. Сборник содержит тезисы докладов участников конференции по вопросам клинической цитогенетики, цитогенетики нарушений индивидуального развития и репродукции, пренатальной и преимплантационной генетической диагностики хромосомных болезней, цитогенетического мониторинга мутагенных воздействий, проблемам эпигенетики многофакторных заболеваний.

Предназначен для специалистов в области медицинской генетики и генетики человека, научных работников, преподавателей, врачей, клинических ординаторов, аспирантов и студентов.

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-015-20034.

УДК 575:616-056.7(045)
БББ 52.54я5

Научное издание

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА И ПАТОЛОГИЯ
Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики

Сборник научных трудов

Выпуск 12

Ответственный за выпуск **Е.Е. Степанова**
Корректор **Е.В. Литвинова**
Оригинал-макет **Л.Д. Кривцовой**
Дизайн обложки **Е.Ю. Хитринской**

Подписано в печать 11.11.2019 г. Формат 60 x 84 1/8. Печать офсетная. Гарнитура Arial.
Печ. л. 9,25. Усл. печ. л. 9,00. Тираж 500 экз. Заказ 245.

ISBN 978-5-990805-11-8

© НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, 2019
© ООО «Литературное бюро», макет, 2019

ПРЕДИСЛОВИЕ

Научные конференции «Генетика человека и патология», организуемые НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, традиционно становятся важным событием в области медицинской генетики и генетики человека в России. Это уникальное мероприятие, превратившееся за годы своего существования в визитную карточку Института, объединяет на своих площадках ученых и врачей, специалистов медико-генетических служб и представителей пациентских организаций, клинических ординаторов и аспирантов, компании, производящие или реализующие на отечественном рынке оборудование, реагенты или лекарственные препараты для диагностики, лечения и профилактики наследственных болезней.

XII научная конференция является тематической и посвящена памяти член-корреспондента РАМН, доктора биологических наук, профессора Сергея Андреевича Назаренко, с именем которого связано создание лаборатории цитогенетики в Томском НИИ медицинской генетики. В день открытия конференции, 20 ноября 2019 г., нашему наставнику и коллеге исполнилось бы 70 лет. Кругозор, эрудиция и широта научных интересов профессора С.А. Назаренко предопределили многочисленные векторы развития цитогенетических исследований, актуальность которых не исчезает и в наши дни. Не случайно в программе конференции обозначены лекции и доклады по таким вопросам, которые всегда были в фокусе научных интересов профессора С.А. Назаренко – цитогенетика нарушений индивидуального развития и репродукции, пренатальная диагностика и молекулярно-цитогенетические технологии диагностики хромосомных болезней, микроцитогенетические синдромы, цитогенетика мутагенных воздействий, проблемы эпигенетики и неклассического наследования, структурно-функциональная организация хромосом. Материалы этих научных докладов находятся на страницах данного сборника, представляя собой, по существу, временной срез современного состояния отечественных цитогенетических исследований. Вместе с тем, это и некоторый ретроспективный взгляд на развитие идей Сергея Андреевича в эпоху прогресса геномных, постгеномных, клеточных и биоинформационных технологий в медицинской генетике.

Проведение научной конференции – замечательный повод вспомнить об идеях профессора С.А. Назаренко, встретить и приветствовать его друзей, коллег и учеников, обсудить животрепещущие проблемы современной цитогенетики и наметить перспективы новых увлекательных исследований.

Председатель программного комитета XII научной конференции
«Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической
и молекулярной цитогенетики»
д-р биол. наук, профессор РАН И.Н. Лебедев

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЕТОДОМ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА У ЖИТЕЛЕЙ ПРИБРЕЖНЫХ СЕЛ Р. ТЕЧИ

Ю.Р. Ахмадуллина

Челябинский государственный университет, г. Челябинск
Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, г. Челябинск

В настоящее время актуальной проблемой радиационной биологии является изучение отдаленных эффектов низкоинтенсивного хронического облучения у человека. Зачастую в основе эффектов облучения лежат повреждения клеточной ДНК.

Как известно, в Челябинской области в период с 1949 по 1956 г. ПО «Маяк» осуществляло сбросы жидких радиоактивных отходов в р. Течу, вследствие чего жители прибрежных сел подверглись хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию. Облучение было комбинированным: внешнее γ-облучение и внутреннее β-облучение преимущественно за счет инкорпорации ^{89}Sr, ^{90}Sr. Обследование этих людей в отдаленном периоде после радиационного воздействия свидетельствует о повышенном мутационном процессе в их соматических клетках. Так, например, у облученных жителей прибрежных сел р. Течи был значительно повышен уровень нестабильных хромосомных аберраций и TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови [1, 2]. Кроме того, установлено, что в когорте людей, проживающих в прибрежных селах р. Течи, повышен риск развития злокачественных новообразований и лейкозов [3]. Все это свидетельствует о том, что для оценки генотоксических эффектов радиационного воздействия представляет интерес цитогенетический биомониторинг, выявляющий повреждения хромосомной ДНК у данных лиц. Одним из признанных методов для целей биомониторинга является исследование повреждений ДНК с помощью микроядерного теста.

Цель исследования – изучить исходный уровень лимфоцитов с микроядрами у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в отдаленные сроки (за 20-летний период наблюдения).

В группу обследования вошли 418 облученных жителей прибрежных сел р. Течи, средняя кумулятивная доза облучения на красный костный мозг составила (0,85 ± 0,03) Гр (TRDS-2016) [4]. Контрольную группу составили 263 необлученных жителя Челябинской области, проживающих в сходных социально-экономических условиях. Характеристика обследованных групп представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика обследованных индивидов

Группа	Возраст, лет $M \pm m$ (min–max)	Пол				Национальность			
		Мужчины		Женщины		Славяне		Татары, башкиры	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Облученные индивиды, n = 418	68,6 ± 0,3 (51–90)	167	40,0	251	60,0	172	41,1	246	58,9
Группа сравнения, n = 263	67,7 ± 0,4 (52–84)	80	30,4	83	69,6	45	51,0	118	49,0

Примечание. n – число обследованных индивидов.

Результаты исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Частота лимфоцитов с микроядрами, ‰

Сравниваемые группы	Частота лимфоцитов с микроядрами, $M \pm \sigma$ (min–max)	p
Облученные лица	18,06 ± 0,49 (2–66)	–
Группа сравнения	17,98 ± 0,60 (3–66)	–
Облученные лица:		
мужчины	15,26 ± 0,60 (2–41)	0,0001
женщины	19,92 ± 0,68 (4–66)	
Группа сравнения:		
мужчины	17,28 ± 1,23 (3–66)	–
женщины	18,29 ± 0,66 (4–56)	–
Облученные лица:		
славяне	18,58 ± 0,76 (2–56)	–
татары, башкиры	17,77 ± 0,76 (5–56)	–
Группа сравнения:		
славяне	17,69 ± 0,60 (3–66)	–
татары, башкиры	18,24 ± 0,94 (3–66)	–

Методика микроядерного теста подробно описана в работе [5].

Анализ представленных результатов позволил сделать следующие выводы:

– исходная частота лимфоцитов с микроядрами у хронически облученных лиц не отличалась от контрольных значений в отдаленные сроки после радиационного воздействия;

– в группе облученных лиц частота лимфоцитов с микроядрами была статистически значимо выше у женщин по сравнению с мужчинами. В группе сравнения частота клеток с микроядрами у женщин была выше, чем у мужчин, но не достигала уровня статистической значимости;

– у облученных мужчин частота клеток с микроядрами была ниже, чем у мужчин из группы сравнения, но это снижение было статистически не значимо;

– частота клеток с микроядрами не зависела от национальной принадлежности обследованных лиц.

Литература

1. *Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O., Akleyev A.V.* Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure // Mutat. Res. 2013. V. 756, № 1–2. P. 115–118.
2. *Akleev A.V., Veremeeva G.A., Kyoizumi S.* Long-term effects of chronic radiation exposure on the level of somatic mutations in peripheral blood cells // Radiats. Biol. Radioecol. 1998. V. 38, № 4. P. 573–585.
3. *Аклеев А.В., Крестинина Л.Ю.* Канцерогенный риск у жителей прибрежных сел реки Теча // Вестник Российской академии медицинских наук. 2010. № 6. С. 34–39.
4. *Дегтева М.О., Толстых Е.И., Шагина Н.Б. и др.* Дозы облучения населения, проживавшего на реке Тече // Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи / под ред. проф. А.В. Аклеева, Челябинск: Книга, 2016. 390 с.
5. *Ахмадуллина Ю.Р., Аклеев А.В., Шалагинов С.А. и др.* Влияние факторов радиационной и нерадиационной природы на уровень микроядер в лимфоцитах периферической крови у потомков первого поколения, отцы которых были облучены // Вопросы радиационной безопасности. 2013. № 4. С. 62–71.

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК В РАЗВИТИЕ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Н.П. Бабушкина, А.Е. Постригань, Е.Ю. Хитринская, А.Н. Кучер

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Гены белков систем репарации ДНК можно рассматривать как относительно новый класс генов-кандидатов многофакторных патологий различной этиологии. Вовлечение генов данных систем в развитие патологического процесса активно изучается при онкологических заболеваниях, определении ответа на воздействие химических веществ и радиации. Ассоциации полиморфных вариантов генов систем репарации с широко распространенными заболеваниями выявлены в небольшом числе исследований, причем это почти случайные находки, например при проведении GWAS [1]. Только при изучении сердечно-сосудистой патологии гены систем репарации ДНК иногда рассматриваются в качестве кандидатных [2, 3]. Комплексный анализ ассоциаций генов различных репарационных систем с патологическими состояниями не онкологической природы ранее не проводился.

В настоящем исследовании изучена изменчивость восьми SNP в генах белков различных репарационных систем (*TP53BP1* (rs560191), *NBN* (rs1805800, rs709816), *MRE11A* (rs473297), *ATM* (rs1189037, rs1801516), *MLH1* (rs1799977), *PMS2* (rs1805321)) в 1 180 образцах ДНК. В исследование включены: группа больных ишемической болезнью сердца (ИБС, n = 180), аутопсийный материал больных, умерших от заболеваний сердечно-сосудистой системы в возрасте до 55 лет (Аут-ИБС, n = 59), долгожители (Гер, n = 131), две группы больных с бронхиальной астмой – с преобладанием аллергического компонента (БА, n = 171) и смешанная (сложное коморбидное состояние, включающее бронхиальную астму, артериальную гипертензию и ряд других заболеваний; БА_АГ, n = 85), больные туберкулезом легких (ТБ, n = 168); а также популяционная выборка г. Томска, привлеченная в качестве контроля (К, n = 386). Более 95% обследованных лиц являлись русскими, для всех случаев получено информированное согласие. Генотипирование проводили методом SNaPshot-анализа на платформе ABI Genetic Analyzer 3730. Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых методов (χ^2, *OR* с 95%-м доверительным интервалом (*CI*), анализ подразделенности, метод главных компонент); статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Установлено, что изученные генетические маркеры четко дифференцируют исследованные группы; наибольший вклад в различия между сравниваемыми группами вносят два SNP в гене *ATM*: χ^2 = 16,76 (*d.f.* = 6) для rs1189037 и χ^2 = 24,36 (*d.f.* = 6) для rs1801516.

При сравнении с популяционным контролем наибольшее число статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов показано для бронхиальной астмы; ассоциации выявлены для SNP трех генов – *NBN*, *ATM*, *MLH1*. Для группы БА рисковыми являются: генотип CT rs1805800 в гене *NBN* (*OR* = 1,74; 95% *CI*: 1,14–2,66; χ^2 = 6,66; p = 0,0098); аллель G (*OR* = 1,59; 95% *CI*: 1,21–2,09; χ^2 = 11,35; p = 0,0008) и генотип GG (*OR* = 2,00; 95% *CI*: 1,26–2,66; χ^2 = 3,18; p = 0,0028) rs1189037 в гене *ATM*; аллель A (*OR* = 1,52; 95% *CI*: 1,12–2,07; χ^2 = 7,23; p = 0,007) и генотип AA (*OR* = 1,60; 95% *CI*: 1,08–2,37; χ^2 = 5,47; p = 0,02) rs1799977 в гене *MLH1*. Предрасполагающий эффект выявлен для сочетания генотипов CT/AG/AA этих трех маркеров (*OR* = 2,07; 95% *CI*: 1,10–3,88; χ^2 = 5,24; p = 0,022); сочетаний генотипов в генах *ATM*/*MLH1*: rs1189037/rs1799977 (GG/AG: *OR* = 1,96; 95% *CI*: 1,00–3,79; χ^2 = 3,9; p = 0,048), rs1801516/rs1799977 (GG/AA: *OR* = 1,66; 95% *CI*: 1,04–2,65; χ^2 = 4,51; p = 0,034), rs1189037/rs1801516/rs1799977 (AG/GG/AA: *OR* = 1,84; 95% *CI*: 1,04–3,25; χ^2 = 4,39; p = 0,036); а также для сочетания генотипов CT/AG для rs1805800/rs709816 в гене *NBN* (*OR* = 1,63; 95% *CI*: 1,04–2,56, χ^2 = 4,54;

p = 0,033). Протективным эффектом в отношении развития БА обладают генотипы CC rs1805800 (*OR* = 0,56; 95% *CI*: 0,35–0,89; χ^2 = 6,25; p = 0,012), AA rs1189037 (*OR* = 0,58; 95% *CI*: 0,37–0,90, χ^2 = 5,88; p = 0,015), GG rs1799977 (*OR* = 0,34; 95% *CI*: 0,11–0,93; χ^2 = 4,51; p = 0,03); сочетания генотипов CC/AA для rs1805800/rs709816 в гене *NBN* (*OR* = 0,49; 95% *CI*: 0,28–0,87; χ^2 = 6,29; p = 0,012).

Предрасполагающими к развитию БА_АГ являются: генотип AA rs1799977 в гене *MLH1* (*OR* = 1,84; 95% *CI*: 1,10–3,05; χ^2 = 5,63; p = 0,02), аллель G (*OR* = 2,67; 95% *CI*: 1,27–5,80; χ^2 = 7,27; p = 0,007) и генотип GG (*OR* = 2,52; 95% *CI*: 1,15–5,69; χ^2 = 5,52; p = 0,019) rs1801516 гена *ATM*, сочетание генотипов AG/GG rs1189037/rs1801516 в гене *ATM* (*OR* = 1,91; 95% *CI*: 1,07–3,42; χ^2 = 4,84; p = 0,028); протективным эффектом обладает генотип AG rs1799977 в гене *MLH1* (*OR* = 0,52; 95% *CI*: 0,31–0,88; χ^2 = 6,09; p = 0,014).

Ранее нами [4] не было показано значимых различий по частотам аллелей и генотипов исследованных локусов между популяционной выборкой и группой пациентов с ИБС, но зарегистрированы ассоциации с рядом качественных и количественных клинических признаков ИБС. Тем не менее анализ сочетаний генотипов изученных маркеров выявил предрасполагающий эффект CT/GG для rs1805800/rs709816 в гене *NBN* (*OR* = 2,22; 95% *CI*: 1,02–4,82; χ^2 = 4,09; p = 0,043) и AG/AG для rs1801516/rs1799977 в генах *ATM*/*MLH1* (*OR* = 1,69; 95% *CI*: 1,02–2,80; χ^2 = 4,21; p = 0,04). Кроме того, при сравнении выборки больных ИБС с другими включенными в исследование группами установлены статистически значимые различия с выборками БА, БА_АГ, ТБ, Гер по локусу rs1801516 в гене *ATM*, причем максимальные различия зарегистрированы при сравнении больных ИБС и БА_АГ (для аллелей χ^2 = 9,86; p = 0,002; для генотипов χ^2 = 10,72; p = 0,005).

К развитию ТБ предрасполагают аллель G (*OR* = 1,53; 95% *CI*: 1,00–2,33; χ^2 = 3,9; p = 0,048) и генотип GG (*OR* = 1,64; 95% *CI*: 1,01–2,67; χ^2 = 4,01; p = 0,045) rs1801516 в гене *ATM*. Кроме того, были зарегистрированы статистически значимые различия по частотам аллелей и генотипов по rs1805800 в гене *NBN* между группами больных БА и ТБ (для аллелей χ^2 = 3,995; p = 0,046; для генотипов χ^2 = 7,708; p = 0,02), по rs1799977 в гене *MLH1* – между группами больных БА и ТБ (для аллелей χ^2 = 5,07; p = 0,024; для генотипов χ^2 = 6,67; p = 0,036) и БА_АГ и ТБ (для генотипов χ^2 = 6,14; p = 0,046). Для SNP в гене *NBN* при разнице в 8,6% по частотам аллелей между группами БА и ТБ различия по частоте генотипа CT составили 14,1%, генотипа CC – 15,7%. Для маркера в гене *MLH1* разница в частотах аллелей между группами ТБ и БА составила 8,51%, между ТБ и БА_АГ – 7,01%. Однако более выраженные различия наблюдали при сравнении групп БА_АГ и ТБ: различия по частоте регистрации генотипа AA достигали 15,3%, генотипа AG – 16,5% (между группами БА и ТБ различия по частоте регистрации этих генотипов составили 11,78 и 6,53% соответственно). Вероятно, полиморфизм генов *NBN* и *MLH1* может вносить вклад в формирование дистропных взаимоотношений между бронхиальной астмой и туберкулезом.

Полученные данные свидетельствуют, что изученные маркеры могут вносить вклад в определение продолжительности жизни. Статистически значимых различий между группой Гер и популяционной выборкой ни по одному из изученных маркеров не установлено. Однако частоты аллелей и генотипов ряда SNP (rs1805800 в гене *NBN*, rs1189037и rs1801516 в гене *ATM*, rs1799977 в гене *MLH*), а также различных сочетаний генотипов данных маркеров в группе долгожителей отличались от частот в группах больных БА и ИБС. Примечательно, что значительные различия по частоте регистрации генотипов и их сочетаний выявлены между группой долгожителей и выборкой лиц, умерших от заболеваний сердечно-сосудистой системы в молодом возрасте (аутопсийный материал). Так, между данными группами различия по частоте гомозиготных генотипов по частым аллелям rs1189037 и rs1801516 превышали 12% (а по их сочетанию – 13,27%), по сочетанию генотипов AG/AG для rs1189037/rs1799977 (в генах *ATM* и *MLH1* соответственно) достигали 12,15%; наибольшие различия (16,25%) выявлены по частоте регистрации гетерозиготного генотипа rs473297 в гене *MRE11*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об ассоциированности генов систем репарации с широким спектром физиологических состояний человека, что указывает на актуальность более активного их привлечения к исследованиям по оценке риска развития широко распространенных заболеваний.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Verschuren J.J.W., Trompet S., Deelen J. et al.* Non-homologous end-joining pathway associated with occurrence of myocardial infarction: gene set analysis of genome-wide association study data // PLoS ONE. 2013. V. 8 (2): e56262.
2. *Guven M., Guven G.S., Oz E. et al.* DNA repair gene *XRCC1* and *XPD* polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency // Heart Vessels. 2007. V. 22. P. 355–360.
3. *Guo Z., Kozlov S., Lavin M.F. et al.* ATM activation by oxidative stress // Science. 2010. V. 330. P. 517–521.
4. *Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Кучер А.Н.* Вовлеченность гена *MLH1* в формирование клинических особенностей ИБС // Новые технологии – в практику здравоохранения: материалы Российского национального конгресса кардиологов. Москва, 25–28 сентября, 2018 г. С. 1003.

РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЛЕГКОГО

М.Л. Баканова, В.И. Минина, Я.А. Савченко, А.Н. Глушков, О.А. Соболева

Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово

Рак легкого (РЛ) является одной из наиболее распространенных форм рака и одной из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний во всем мире [1]. Одним из основных гистологических типов РЛ является аденокарцинома легкого (АКЛ). Рак человека часто ассоциируется с хромосомной нестабильностью, включая как численные, так и структурные хромосомные аберрации (ХА) [2–4]. Ряд исследований свидетельствует о прогностической эффективности оценки ХА в лимфоцитах крови для расчета индивидуальных рисков и канцерогенных эффектов [5–7]. Однако до сих пор не установлено, что может индуцировать нарушения хромосом у больных с солидными опухолями. С одной стороны, ХА являются маркерами биологических эффектов воздействия мутагенов окружающей среды. С другой стороны, не стоит исключать вклад наследственно обусловленной чувствительности к действию мутагенов, а также влияние процессов злокачественной трансформации в организме.

Цель данного исследования – анализ взаимодействия генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, контроля клеточного цикла и апоптоза, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB, теломеразной обратной транскриптазы при формировании хромосомных нарушений у больных АКЛ.

Материал и методы. Обследовано 670 жителей Кемеровской области. 304 человека (213 мужчин, 91 женщина; 186 курящих, 118 некурящих) – это больные РЛ, первично поступившие на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер. До забора крови для цитогенетического исследования больные не получали химиотерапевтического или радиологического лечения и составили исследуемую группу. После проведения обследования специалистами онкологического диспансера у всех обследованных была выявлена форма РЛ АКЛ. 366 человек (295 мужчин, 71 женщина; 157 курящих, 209 некурящих) – это доноры Кемеровского областного центра крови (жители той же местности, что и больные РЛ), которые к моменту сбора материала были здоровы, не имели хронических заболеваний, не принимали лекарственных препаратов, в течение 3 месяцев до начала исследования не подвергались рентгенологическим обследованиям. Все представители группы сравнения не имели признаков онкопатологии в анамнезе и не имели близких родственников (I, II степень родства) с онкозаболеваниями. Все обследованные доноры подписали форму информированного согласия на участие в иследовании.

Культивирование лимфоцитов крови для получения препаратов хромосом осуществляли по стандартному полумикрометоду [8]. Полиморфные варианты генов *APEX1* (rs1130409), *OGG1* (rs1052133), *ADPRT* (rs1136410), *XPD* (rs13181), *EGFR* (rs2227984), изучали аллель-специфической ПЦР (НПФ «Литех», г. Москва), а полиморфных вариантов *CYP1A1* (rs1048943), *CYP1A2* (rs762551), *TP53* (rs1042522), *TERT* (rs2736100) – Real-time PCR (TaqMan assay, ООО «СибДНК», г. Новосибирск). Делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* анализировали с помощью мультиплексной ПЦР с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I (ООО «СибДНК», г. Новосибирск).

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программ: SNPstats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats), Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), MDR (http://www.multifactordimensionalityreduction.org).

Результаты. В результате проведенного исследования установлено, что средняя частота ХА у больных АКЛ значимо выше, чем в группе сравнения ((3,14 ± 0,18)% против (1,47 ± 0,07)%; p = 0,000001). Отношение шансов для ХА у больных АКЛ после введения поправок на основные конфаундеры (пол, возраст, курение) составило: OR_{adj} = 1,66; 95% *CI* = 1,43–1,89; p_{adj} = 0,000008.

Далее было проведено сравнение частот аллелей полиморфных вариантов изученных генов между выборкой больных АКЛ и группой здоровых жителей. Выявлены связи с риском развития АКЛ полиморфизмов генов *XPD* (T2251G) (OR_{adj} = 1,88; 95% *CI*: 1,30–2,71; p_{adj} = 0,00006, *AIC* = 754,7; p_{cor} = 0,00066 – для доминантной модели наследования) и *OGG1* (C977G) (OR_{adj}: 1,71; 95% *CI*: 1,31–2,23; p_{adj} = 0,0001; *AIC* = 750,4; p_{cor} = 0,0011 – для лог-аддитивной модели наследования).

Анализ структуры межгенных взаимодействий при формировании ХА у больных АКЛ позволил выявить статистически значимую трехлокусную модель, которая включала в себя гены *CYP1A2* (rs762551, C>A), *OGG1* (rs1052133, C>G), *TP53* (rs1042522, G>C) (воспроизводимость модели (CVC) – 10/10; точность (*Pre*) = 0,8902; p < 0,0001). Кластерный анализ позволил установить тесное взаимодействие и взаимное усиление между полиморфными локусами *CYP1A2* (rs762551, C>A) и *OGG1* (rs1052133, C>G). Влияние локуса *TP53* (rs1042522, G>C) было независимым. Наибольший вклад оказывал ген *CYP1A2* (rs762551, C>A) (*H* (энтропия) = 3,47%).

Таким образом, установлена роль изученных полиморфных вариантов генов в формировании риска АКЛ. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят расширить представления о причинах возникновения ХА у больных АКЛ и установить возможную их роль в возникновении данного онкологического заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № ГЗ 0352-2019-0011 (ЕГИСУ НИОКР АААА-А17-117041410052-4).

Литература

1. *Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN

sources and methods // Int. J. Cancer. 2019. V. 144, № 8. P. 1941–1953.
2. *Futreal A., Coin L., Marshall M. et al.* A census of human cancer genes // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4, № 3. P. 177–183.
3. *Rajagopalan H., Lengauer C.* Aneuploidy and cancer // Nature. 2004. V. 432, № 7015. P. 338–341.
4. *Burrell R.A., McClelland S.E., Endesfelder D. et al.* Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability // Nature. 2013. V. 494, № 7438. P. 492–496.
5. *Исламов З.С., Гильдиева М.С., Усманов Р.Х.* Анализ цитогенетических изменений и их роль в ранней диагностике ретинобластомы // Практическая медицина. 2015. Т. 1. С. 137–139.
6. *Vodenkova S., Polivkova Z., Musak L. et al.* Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients // Mutagenesis. 2015. V. 30, № 4. P. 557–563.
7. *Minina V.I., Sinitsky M.Yu., Druzhinin V.G. et al.* Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution // Eur. J. Cancer Prevention. 2018. V. 27, № 4. P. 6–12.
8. *Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д. и др.* База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных аберраций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. 2001. Т. 37, № 4. С. 549–557.

БАЗОВЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ЛИМФОЦИТАХ И БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Е.Д. Баранова[1], Т.А. Головина[1], А.В. Мейер[1], В.И. Минина[2], А.О. Михайлова[1], А.А. Тимофеева[2], Д.П. Шубенкина[1], В.Г. Дружинин[1]

[1] Кемеровский государственный университет, г. Кемерово
[2] Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово

Принято считать, что развитие рака обычно зависит от ряда мутационных или эпигенетических событий, а первоначальная повышенная нестабильность генома увеличивает вероятность последующих негативных изменений [1]. Связь геномной нестабильности с ранними событиями в канцерогенезе подтверждается тем фактом, что повышенные уровни повреждений хромосом часто выявляются в нормальных клетках недавно диагностированных (нелеченных) пациентов с новообразованиями различных локализаций. Однако данные литературы о частотах спонтанных цитогенетических повреждений лимфоцитов у пациентов с солидными опухолями не лишены противоречий. В частности, метаанализ частот микроядер в лимфоцитах нелеченных пациентов с различной локализацией опухолей показал, что только 72% образцов, включенных в исследование, продемонстрировали увеличение спонтанной частоты микроядер у пациентов по сравнению с контрольными донорами [2]. Данный факт указывает на необходимость продолжения исследований в этом направлении, в том числе и по оценке базового уровня нестабильности генома с использованием различных биомаркеров эффекта у пациентов с наиболее значительными формами рака.

Рак легкого (РЛ) является наиболее распространенной злокачественной опухолью и одной из основных причин смертности в мире. В недавней публикации [3] мы показали, что частота хромосомных аберраций в лимфоцитах нелеченных больных раком легкого была значительно увеличена по сравнению со здоровыми донорами. Продолжая это исследование, в настоящем сообщении мы представляем новые результаты с одновременным использованием трех цитогенетических биомаркеров: хромосомных аберраций (ХА) и микроядер (МЯ) в лимфоцитах, а также микроядер в буккальных эпителиоцитах – для оценки уровня геномной нестабильности у пациентов с раком легкого.

Базовые частоты ХА и МЯ были проанализированы у 43 пациентов с первично диагностированным раком легкого (только мужчины, средний возраст (59,9 ± 4,8) года), поступивших в Кемеровский областной онкологический диспансер, и у 44 здоровых мужчин-доноров, жителей г. Кемерово (средний возраст (52,7 ± 5,8) года). Образцы крови от пациентов с раком легкого были получены до всех диагностических или терапевтических процедур. Все участники были проинформированы о цели, методологии и возможных рисках исследования; информированное согласие было подписано каждым донором. От каждого обследуемого было изучено по 200 метафаз с учетом всех основных типов структурных аберраций хромосом, по 1 000 двуядерных лимфоцитов (микроядра, межъядерные мосты, протрузии), а также по 1 000 клеток буккального эпителия (микроядра, нуклеоплазменные мосты, протрузии).

В результате исследования были обнаружены существенные различия в уровнях изученных цитогенетических маркеров между пациентами и здоровыми донорами. У пациентов с раком легкого наблюдалась повышенная частота двуядерных лимфоцитов с одним МЯ ((1,35 ± 0,62)% против (0,69 ± 0,23)%, $p < 0,0001$), двуядерных лимфоцитов с двумя МЯ ((0,1 ± 0,1)% против (0,04 ± 0,02)%, $p < 0,05$), двуядерных лимфоцитов с более чем двумя МЯ ((0,04 ± 0,06)% против (0,01 ± 0,02)%, $p < 0,01$) и общая частота двуядерных клеток с МЯ ((1,48 ± 0,65)% против (0,74 ± 0,26)%, $p < 0,0001$) по сравнению с контролем. Другие цитогенетические параметры также показали значимое увеличение у пациентов с раком легких. Например, частота двуядерных лимфоцитов с межъядерными мостами составила у больных раком легкого (0,63 ± 0,63)% (в контрольной выборке – (0,21 ± 0,15)%), а частота одноядерных лимфоцитов с МЯ составила (0,71 ± 0,53)% и (0,27 ± 0,18)% соответственно. Только по одному цитогенетическому индикатору – «двуядерные лимфоциты с протрузиями» – не показано различий между пациентами и контрольной группой ((1,98 ± 0,97)% против (1,93 ± 1,21)%) соответственно.

Больные раком легкого показали значимое увеличение частоты лимфоцитов с ХА по сравнению с контрольными донорами ((3,26 ± 1,7)% и (1,85 ± ± 0,99)%; p = 0,000027). Важно отметить, что увеличение доли аберрантных метафаз, наблюдаемое у пациентов, достигалось исключительно за счет аберраций хромосомного типа (двойных фрагментов и обменов), в то время как никаких существенных различий в частотах аберраций хроматидного типа между больными раком легкого и контрольными донорами обнаружено не было.

Микроядерный тест в буккальных эпителиоцитах также показал однонаправленное увеличение базового уровня цитогенетических повреждений в этом типе клеток у больных раком легкого. В частности, доля клеток с МЯ у пациентов составила в среднем (0,46 ± 0,13)‰, а у контрольных доноров – (0,23 ± 0,12)‰ (p = 0,0096). В буккальных эпителиоцитах пациентов с повышенными частотами отмечены также различные деструктивные изменения ядра (вакуолизация, пикноз, рексис и лизис), отражающие ускоренную гибель клеток по некротическому и апоптотическому пути.

Результаты этого комплексного исследования трех цитогенетических биомаркеров генотоксического эффекта подтверждают, что рак легкого ассоциируется с повышенными базовыми частотами ХА и МЯ по сравнению со значениями у контрольных доноров.

Использование этих биомаркеров дает дополнительную информацию, которая позволяет более объективно оценивать генетическую нестабильность при раке легкого, проводить скрининг индивидов с повышенным риском развития рака и отслеживать генотоксические эффекты у пациентов во время и после терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00022).

Литература

1. *Jeggo P.A., Pearl L.H., Carr A.M.* DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective // Nat. Rev. Cancer. 2016. V. 16, № 1. P. 35–42.
2. *Iarmarcovai G., Ceppi M., Botta A. et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis // Mutat. Res. 2008. V. 659, № 3. P. 274–283.
3. *Minina V.I., Sinitsky M.Y., Druzhinin V.G. et al.* Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution // Eur. J. Cancer Prev. 2018. V. 27, № 1. P. 6–12.

КЛИНИЧЕСКАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ И ХРОМОСОМНЫМИ МИКРОДУПЛИКАЦИЯМИ

Е.О. Беляева[1], А.А. Кашеварова[1], Н.А. Скрябин[1], М.Е. Лопаткина[1], О.А. Салюкова[1, 2], М.Н. Филимонова[1], О.В. Лежнина[1], А.Р. Шорина[3, 4], А.Б. Масленников[4], Д.А. Федотов[2], Д.А. Дериглазов[2], Л.П. Назаренко[1, 2], И.Н. Лебедев[1, 2]

[1] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск*
[2] *Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*
[3] *Новосибирский областной детский клинический психоневрологический диспансер, г. Новосибирск*
[4] *Городская клиническая больница № 1, г. Новосибирск*

Этиология такой широко распространенной и социально значимой патологии, как умственная отсталость, у детей сложна и недостаточно изучена, учитывая не только разнообразие причинных факторов, но и различные механизмы их взаимодействия, в том числе на молекулярном уровне. Среди генетических компонентов, привносящих весомый вклад в формирование интеллектуальных расстройств, особое место занимают вариации числа копий участков ДНК или CNV [1]. Несмотря на то что для многих хромосомных микроперестроек показана связь с известными синдромами, зачастую оценка патогенетической значимости выявляемых хромосомных микроделеций или микродупликаций остается сложной задачей, поскольку большинство из них являются редкими и представлены единичными наблюдениями. Широкий спектр CNV с неопределенным клиническим значением требует дальнейшего изучения на обширных когортах больных для идентификации общих субмикроскопических перестроек и характеристики соответствующих им клинических симптомов, что необходимо для улучшения диагностики и ведения пациентов. Интересен и тот факт, что к настоящему времени зарегистрировано количественное преобладание хромосомных микроделеций с доказанной патогенетической значимостью относительно микродупликаций [2]. Последний тип изменений копийности участков ДНК до сих пор остается недооцененным в научной литературе, что поддерживает интерес к их системной клинической и цитогенетической характеристике.

Цель исследования – провести поиск патогенетически значимых хромосомных микродупликаций у пациентов с недифференцированной умственной отсталостью и охарактеризовать их клинические проявления.

Материал и методы. Обследовано 445 пациентов с недифференцированными формами умственной отсталости в возрасте от 1 года до 18 лет методом микроматричной сравнительной геномной гибридизации (array CGH). Поиск микроструктурных хромосомных аберраций осуществлялся с помощью микрочипов Human Genome CGH SurePrintG3 HumanCGH 8×60K (Agilent Technologies, США) согласно рекомендациям производителя. Результаты визуализировались в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация клинической значимости CNV проводилась

с использованием базы данных геномных вариантов (DGV) и онлайн-версии каталога наследственных болезней «Менделевское наследование у человека» (OMIM). Подтверждение наличия обнаруженных патогенетически значимых микродупликаций у пробандов и установление их происхождения при анализе доступного биологического материала членов семьи выполнялось с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies, США). Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и проводилось после получения информированного согласия от родителей или опекунов пациентов.

Результаты. Установлено, что хромосомные микродупликации встречаются в выборке пациентов с недифференцированной умственной отсталостью с частотой 14% (у 60 пациентов): в 1% случаев зарегистрированы микродупликации, локализованные в регионах известных микродупликационных синдромов (3 пациента), в 13% – микродупликации, относящиеся к классу CNV с неопределенным клиническим значением (57 пациентов). Определена частота патогенных и потенциально патогенных сегментных трисомий, подтвержденных альтернативным методом молекулярно-генетического анализа, составившая 6% в данной группе больных. Установлено происхождение хромосомных микродупликаций: 46% были унаследованы от матери, 27% имели отцовское происхождение, а 27% микродупликаций возникли *de novo*. При этом показано, что частичные трисомии, имеющие размер до 1,5 млн п.н., статистически значимо чаще являются унаследованными по сравнению с хромосомными перестройками большей протяженности (p = 0,03).

Заключение. Хромосомные микродупликации вносят заметный вклад в структуру цитогенетических причин нарушений интеллектуального развития в детском возрасте и заслуживают пристального внимания. Использование современных методов молекулярно-цитогенетического анализа позволяет существенно улучшить диагностику и профилактику хромосомных заболеваний.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Kearney H.M., Thorland E.C., Brown K.K. et al.* American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants // Genet. Med. 2011. V. 13, № 7. P. 680–685.
2. *Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.* Геномная архитектура хромосомных болезней человека // Генетика. 2016. Т. 52, № 5. С. 511–528.

CLINICAL UTILITY OF MLPA AND QF-PCR TECHNIQUES IN THE DIAGNOSIS OF GENETIC CAUSE OF MISCARRIAGE

K. Bernatowicz[1], J. Zimowski[2], I. Łaczmańska[3], K. Piotrowski[4], M. Bednarska-Makaruk[2], M. Sąsiadek[3], J. Gronwald[1]

[1] Department of Genetics and Pathology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland
[2] Department of Genetics, Institute of Psychiatry and Neurology, Warszawa, Poland
[3] Genetics Department, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland
[4] Diagen – Prediag – Prenatal & Cytogenetic Unit, Szczecin, Poland

Background. At least 10% of clinically recognized pregnancies end in miscarriage [1]. Most common reasons of pregnancy loss are chromosomal anomalies of the fetus. According to previous studies, as much as half of spontaneously aborted fetuses are affected by chromosomal aberrations, mainly trisomies [2].

Although research in the genetics of miscarriage has been performed for decades and an extremely high incidence of chromosomal abnormalities among lost pregnancies have been well documented, the testing of aborted fetuses has never been introduced to the routine clinical practice. However, the results of such testing may be an invaluable aid to counselling.

A standard technique for assessment of chromosomal abnormalities in aborted fetuses has been G-band karyotyping. At present, there is a number of molecular methods which skip the necessity of cell culture, as cell culture is particularly vulnerable to external factors and it is loaded with overall failure rate of up to 50% [3]. Several molecular methods are successfully utilized for research and for diagnostics after pregnancy loss.

This study was designed to assess retrospectively the diagnostic yield of two commonly utilized molecular techniques for aneuploidy detection in the product of conception: MLPA and QF-PCR. Our **goal** was to establish the detection rate of both techniques. Also, an important issue which is maternal cell contamination was analyzed in this study.

Material and methods. In this study 667 unsorted miscarriage samples were analyzed overall. 508 samples were tested in the Department of Genetics, Institute of Psychiatry and Neurology using MLPA. Two independent subtelomeric and subcentromeric probe kits were used, targeting all chromosomes. Similar as in our preliminary studies, tissues tested by MLPA were divided into two groups before testing [4]. The first group contained good quality material confirmed as chorionic villi or fetal tissue. The second group consisted of the material of poor quality, where the morphology of tested tissue was not certain. 159 samples were tested in the Genetics Department, Wroclaw Medical University using QF-PCR. The kit used in this study was designed to test for aneuploidies of the chromosomes 13, 15,

16, 18, 21, 22, X, or Y. Studies towards maternal cell contamination were performed. All the material was collected from spontaneous miscarriages between 6-23 week of gestation.

Results. In a group of samples tested by MLPA method, results were obtained in 508 out of 515 samples. In a group of poor-quality material (*n* = 131), categorized previously as containing probably maternal tissues, as many as 127 samples gave a result of a normal female (96.9%). Among good quality samples (*n* = 352) chromosomal abnormalities were revealed in 194 cases (55.1%). Normal results were obtained in 158 cases (44.9%). Trisomies of virtually all chromosomes were present among the tested samples, except of chromosome 1 and 19. Most common aneuploidy was trisomy 16 (33 cases – 9.4% of all samples in this group), then monosomy X (26 cases – 7.4%) and triploidy (22 cases – 6.2%). There were 5 cases of double trisomy (1.4%). Besides numerical chromosomal aberrations, MLPA method allows also to reveal structural abnormalities. Thereby, in 18 cases a structural aberration might have been the reason of a pregnancy loss (5.1% of all samples in this group).

Among 159 samples tested by QF-PCR maternal cell contamination was confirmed in 49 samples and these results were discarded. Among 101 informative results male to female ratio was 47/54. Trisomies were found in 26 cases (25.7%), including two double trisomies. Monosomy X was detected in 13 samples (12.9%). Eleven triploidies occurred (10.9%), 3 of them with 69,XXX karyotype and 8 with one or two Y chromosomes.

Conclusions. Both MLPA and QF-PCR methods may be successfully implemented as an alternative for standard karyotype in testing material from spontaneous abortion. QF-PCR has lower sensitivity comparing to MLPA in detecting aneuploidies. However, in contrast to the latter, it is a good tool for the detection of polyploidies. Maternal cell contamination is an important issue that should be obligatory considered using both techniques.

References

1. *Rai R., Regan L.* Recurrent miscarriage // Lancet. 2006. V. 368 (9535). P. 601–611.
2. *Lebedev I.* Molecular cytogenetics of recurrent missed abortions // Indian J. Med. Res. 2006. V. 124, № 1. P. 9–10.
3. *Bell K.A., Van Deerlin P.G., Haddad B.R., Feinberg R.F.* Cytogenetic diagnosis of “normal 46,XX” karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading // Fertil. Steril. 1999. V. 71, № 2. P. 334–341.
4. *Zimowski J.G., Massalska D., Pawelec M. et al.* First-trimester spontaneous pregnancy loss – molecular analysis using multiplex ligation-dependent probe amplification // Clin. Genet. 2016. V. 89, № 5. P. 620–624.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ХРОМОСОМ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

С.А. Васильев[1], Р.Р. Савченко[1], Н.А. Скрябин[1], М.Е. Лопаткина[1], В.С. Фишман[2], О.В. Грибова[3], Е.С. Сухих[4], И.Н. Лебедев[1]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
[3] Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[4] Томский областной онкологический диспансер, г. Томск

Стабильность генома является неотъемлемым свойством всех живых организмов. Ее качественной составляющей является последовательность генов, за сохранение которой отвечает система репарации ДНК. Однако не меньшую роль играют количественный и структурный аспекты, отражающие копийность генов и их расположение на хромосомах, вследствие чего определяющую роль в выживании организма играет постоянство кариотипа. Необходимость сохранения кариотипа наиболее хорошо иллюстрируется фатальными последствиями хромосомных нарушений на уровне целого организма. Так, у человека анеуплоидия по подавляющему большинству хромосом приводит к гибели эмбрионов на ранних стадиях развития, а числовые нарушения по оставшимся хромосомам связаны со значительным снижением жизнеспособности. То же касается и крупных структурных хромосомных нарушений.

Достаточно давно стало понятным, что в нарушении стабильности генома могут играть важную роль генетические факторы. Это подтверждается существованием ряда синдромов, обусловленных мутациями в генах репарации ДНК и характеризующихся повышенной хромосомной нестабильностью. Кроме того, по-видимому, на частоту хромосомных нарушений в соматических клетках человека могут влиять и полиморфные варианты в генах антиоксидантной защиты, репарации ДНК, апоптоза и метаболизма ксенобиотиков. Однако различная чувствительность к мутагенному воздействию клеток в организме на различных стадиях онтогенеза на фоне одинакового генотипа по определенному набору полиморфных вариантов поднимает вопрос о наличии эпигенетических факторов, влияющих на стабильность генома. Поэтому **целью настоящего исследования** стало выявление связи эпигенетической организации генома со спонтанным и индуцированным уровнем хромосомных нарушений в соматических клетках человека.

Одним из таких эпигенетических факторов может являться глобальный уровень метилирования генома, маркером которого служит индекс метилирования наиболее распространенного в геноме человека семейства ретротранспозонов LINE-1. Нами проведен анализ связи индекса метилирования

LINE-1 с частотой хромосомных нарушений на разных стадиях онтогенеза человека: в экстраэмбриональных тканях 135 абортусов первого триместра беременности и лимфоцитах 107 индивидов на постнатальном этапе онтогенеза, в том числе в условиях хронического воздействия ионизирующего излучения. Было выявлено, что остановка внутриутробного развития организма с нормальным кариотипом ассоциирована со сниженным индексом метилирования LINE-1 в плацентарных тканях человека (как в цитотрофобласте хориона, так и в экстраэмбриональной мезодерме) ($p < 0{,}001$). Кроме того, индекс метилирования LINE-1 в клетках цитотрофобласта хориона обратно пропорционален спонтанной частоте клеток с анеуплоидией по хромосоме 8 ($R = -0{,}53$; $p = 0{,}011$). Наконец, индекс метилирования LINE-1 не связан с частотой анеуплоидных лимфоцитов в постнатальном онтогенезе. Было показано, что сниженный индекс метилирования LINE-1 в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы не влияет на частоту микроядер, тогда как в лимфоцитах периферической крови индекс метилирования LINE-1 отрицательно коррелирует с частотой микроядер ($R = -0{,}35$; $p = 0{,}031$). В лимфоцитах после хронического воздействия инкорпорированного плутония-239 *in vivo* индекс метилирования LINE-1 статистически значимо связан с частотой аберраций хроматидного типа ($R = -0{,}42$; $p = 0{,}012$) и сестринских хроматидных обменов ($R = -0{,}61$; $p = 0{,}00086$). Таким образом, гипометилирование генома связано с повышенной спонтанной частотой анеуплоидных клеток в экстраэмбриональных тканях внутриутробно погибших эмбрионов человека с нормальным хромосомным набором и с частотой микроядер в лимфоцитах на постнатальных этапах онтогенеза. Снижение уровня глобального метилирования генома в лимфоцитах ассоциировано с повышением числа двунитевых разрывов ДНК в S- и G2-фазах клеточного цикла, репарируемых гомологичной рекомбинацией.

Помимо уровня метилирования генома наиболее изученным эпигенетическим феноменом, связанным с поддержанием стабильности генома, является фосфорилирование гистона H2AX (γH2AX), приводящее к формированию фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК. Нами проверялась гипотеза об активирующем влиянии спонтанного уровня фокусов γH2AX на эффективность ответа на радиационно индуцированные повреждения ДНК в лимфоцитах больных в ходе лучевой терапии злокачественных новообразований, в лимфоцитах 54 здоровых индивидов и в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы 18 медицинских абортусов при воздействии ионизирующего излучения в условиях *in vitro*. Обнаружено, что спонтанный уровень фокусов белков репарации ДНК в лимфоцитах остается постоянным для большинства индивидов в ходе лучевой терапии солидных злокачественных новообразований и отрицательно коррелирует с частотой аберраций хромосомного типа после окончания терапии ($R = -0{,}85$; $p = 0{,}0008$). Повышение спонтанного уровня фокусов γH2AX оказалось связано со снижением частоты микроядер, содержащих хромосомные фрагменты, после воздействия радиации *in vitro* (2 Гр; $R = -0{,}37$; $p = 0{,}025$) в лимфоцитах взрослых индивидов в отличие от фибробластов экстраэмбриональной мезодермы (1 Гр; $R = -0{,}38$; $p = 0{,}20$).

С помощью экспрессионных микрочипов была выявлена дифференциальная экспрессия различных генов в лимфоцитах между группами индивидов с высоким и низким уровнями фокусов γH2AX и микроядер. Нокаут генов *ADAMTS1*, *RBFOX2*, *THBS1* и *WHSC1*, проведенный с помощью технологии CRISPR/Cas9, приводит к изменениям выживаемости необлученных и облученных клеток опухолевой линии HeLa. Нокаут генов *WHSC1* и *THBS1* вызывает снижение (в 1,7 раза ($p = 0{,}0002$) и 1,4 раза ($p = 0{,}0002$) соответственно), а нокаут гена *RBFOX2* – повышение эффективности посева клеток (в 1,4 раза, $p = 0{,}00002$). Нокаут генов *WHSC1*, *ADAMTS1* и *RBFOX2* приводит к снижению клональной выживаемости (в 1,6 раза ($p = 0{,}033$), в 1,9 раза ($p = 0{,}014$) и в 1,8 раза ($p = 0{,}017$) соответственно). Нокаут гена *WHSC1* в опухолевой клеточной линии HeLa вызывает повышение спонтанного уровня фокусов γH2AX и 53BP1 (в 2,3 раза ($p = 0{,}0013$) и в 2,1 раза ($p = 0{,}044$) соответственно), а нокаут гена *ADAMTS1* приводит к возрастанию спонтанной частоты микроядер (в 4,3 раза, $p = 0{,}019$).

Таким образом, спонтанный уровень фокусов гистона γH2AX обратно пропорционален частоте хромосомных нарушений после воздействия радиации в лимфоцитах периферической крови, но не в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы. Гены *ADAMTS1*, *RBFOX2*, *WHSC1* и *THBS1*, экспрессия которых зависит от спонтанного уровня фокусов γH2AX в различных типах соматических клеток человека, связаны взаимной транскрипционной регуляцией и влияют на выживаемость клеток.

Полученные результаты указывают на необходимость учета влияния различных эпигенетических модификаций хроматина на спонтанный и индуцированный мутагенез в соматических клетках человека. Такое влияние может быть обусловлено как разворачиванием нормальной программы развития организма, как это происходит в эмбриональном периоде, так и «эпигенетической памятью», позволяющей изменять свойства клеток в ответ на воздействия различных факторов в ходе жизнедеятельности организма.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Исследование выполнено при поддержке гранта президента РФ № МК-5944.2018.4 и гранта РФФИ № 19-34-90143.

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА – КОНОВАЛОВА С ПОМОЩЬЮ ТАРГЕТНОГО МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

О.Ю. Васильева, Н.А. Скрябин, Д.А. Федотов, А.А. Зарубин

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Болезнь Вильсона − Коновалова (гепатоцеребральная дистрофия) – тяжелое моногенное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу, проявляющееся преимущественно в молодом возрасте и характеризующееся избыточным накоплением меди в организме. Наиболее распространенными клиническими проявлениями являются поражение печени и психоневрологические нарушения [1]. К заболеванию приводят мутации гена *ATP7B,* расположенного на хромосоме 13, который кодирует медьтранспортирующую АТФазу – главный регулятор транспорта меди в организме [2]. Ген имеет протяженность 78822 пары оснований и содержит 21 экзон. Распространенность болезни Вильсона − Коновалова – 30 случаев на 1 млн населения, а носителями патологической мутации в гене *ATP7B* являются 1 человек на 90. Болезнь Вильсона − Коновалова встречается одинаково часто как у мужчин, так и у женщин и манифестирует в возрасте 8–16 лет. Без лечения заболевание приводит к смерти от печеночной недостаточности, а также от геморрагических осложнений. В 80% случаев возможно клиническое выздоровление либо выраженное улучшение состояния больных при условии максимально ранней диагностики. Молекулярно-генетическая диагностика мутаций в гене *ATP7B* затруднена, так как заболевание характеризуется высокой генетической гетерогенностью (более 500 возможных патогенных вариантов).

Имеющиеся методы выявления мутаций в гене *ATP7B* либо не дают полной генетической картины заболевания, либо дают много избыточной информации. В связи с этим целесообразной является разработка метода детекции мутаций, приводящих к болезни Вильсона − Коновалова как одному из орфанных заболеваний, на основе таргетного массового параллельного секвенирования длинных ПЦР-фрагментов, покрывающих весь ген *ATP7B.* Это позволяет идентифицировать мутации в экзонах, интронах и промоторе. При большом числе экзонов в гене это часто приводит к снижению числа ПЦР-продуктов по сравнению с секвенированием по Сэнгеру, а значит, к уменьшению трудоемкости. Кроме того, для данного подхода отсутствие частых мутаций не является ограничением, поскольку анализируется вся последовательность экзонов и интронов гена *ATP7B*.

Разработанный метод применили для анализа гена *ATP7B* у троих пациентов с диагностированным заболеванием Вильсона − Коновалова. У всех обследуемых был найден часто встречающийся патогенный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 14 гена *ATP7B* (chr13:52518281G>T) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене аминокислоты в позиции 1069 белка (p.H1069Q, NM_000053) [3]. В базе данных ExAC вариант зарегистрирован с частотой 0,0009085. У первого обследуемого была также обнаружена мутация в экзоне 9 гена *ATP7B* (chr13:52520444G>GG) в гетерозиготном состоянии, не зарегистрированная в ExAC. Мутация приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с кодона 805 (p.G805fs, NM_001005918). У второго обследуемого был выявлен вариант, расположенный в сайте сплайсинга 16-го экзона гена *ATP7B* и не зарегистрированный в ExAC (chr13:52515216C>A). У третьего пациента других значимых изменений, соответствующих критериям поиска, не обнаружено. Однако были выявлены несколько вариантов в интронах гена *ATP7B*, патогенетическая значимость которых остается невыясненной и требует дальнейших исследований.

Таким образом, два из трех пациентов являются компаунд-гетерозиготами по патогенетически значимым вариантам. Разработанный метод таргетного массового параллельного секвенирования позволяет выявлять мутации в гене *ATP7B*, менее трудозатратен по сравнению с используемыми в настоящее время альтернативными подходами. Кроме того, метод может быть применен для поиска мутаций и при других наследственных заболеваниях.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Исследование выполнено в рамках темы «Персонализированное геномное профилирование при орфанных заболеваниях человека» государственного задания НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Литература

1. *Козлова Н.М., Гвак К.В., Гаджибалаева Л.Ш.* Болезнь Вильсона – Коновалова // Сибирский медицинский журнал. 2011. № 5. С. 125–129.
2. *Кляритская И.Л., Работягова Ю.С.* Болезнь Вильсона: клинические рекомендации по диагностике и лечению// Крымский терапевтический журнал. 2012. № 2. С. 51–57.
3. *Rodriguez-Granillo A., Sedlak E., Wittung-Stafshede P.* Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation // J. Mol. Biol. 2008. V. 383, № 5. P. 1097–1111.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ЧАСТОТЫ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ И МИКРОЯДЕР В Т-ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

А.В. Возилова[1], Ю.Р. Ахмадуллина[1, 2]

[1] Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, г. Челябинск
[2] Челябинский государственный университет, г. Челябинск

Одним из перспективных направлений в исследованиях в области радиационной генетики является изучение механизмов индивидуальной радиочувствительности у человека. Актуальность темы обусловлена необходимостью профессионального отбора специалистов, выбором источников и адекватных доз облучения в ходе лучевой терапии, обоснованием необходимости диагностических процедур, выработкой норм радиационной безопасности для населения и персонала и т.д.

Под индивидуальной радиочувствительностью понимают способность биологического объекта определенным образом реагировать на действие ионизирующей радиации. Радиочувствительность человека может быть определена разной реакцией пациентов на лучевую терапию, индукцией специфических (двойных) разрывов ДНК, которые реализуются в хромосомные аберрации (ХА) и частично в микроядра (МЯ) и т.д. [1]. Одним из актуальных вопросов в современной радиобиологии является вопрос о корреляции особенностей генома и его радиочувствительности.

Цель настоящего исследования – изучить влияние хронического низкоинтенсивного облучения организма на радиочувствительность Т-клеток периферической крови при γ-облучении *in vitro* (на основе исследования частоты ХА и клеток с МЯ). Радиочувствительных лиц определяли по показателям, оцененным при исследовании спонтанного уровня и при дозовых нагрузках в условиях γ-облучения крови *in vitro* (0,5; 1 и 2 Гр).

Обследовались лица, ранее подвергшиеся хроническому облучению на Южном Урале в диапазоне доз от 3 до 4 600 мГр на красный костный мозг (ККМ). В группу для цитогенетического исследования периферических Т-лимфоцитов вошли люди до 1960 года рождения, мужского и женского пола, преимущественно трех национальностей (русские, татары, башкиры). Из выборки были исключены лица, имеющие заболевания, способные влиять на уровень ХА и частоту МЯ. Приготовление препаратов метафазных хромосом для оценки частоты нестабильных хромосомных аберраций и препаратов цитокинез-блокированных лимфоцитов подробно описано в работах [2, 3]. Группы обследуемых лиц частично перекрывались. Оценку препаратов проводили при световой микроскопии 10 х 100 на микроскопе Axio Imager Z2 (Германия) с использованием ПО Ikaros.

К радиочувствительным донорам относили тех людей, показатели которых превышали 90-й процентиль [4]. Они считались лицами с повышенным радиобиологическим ответом.

Результаты исследования представлены в табл. 1–3.

Таблица 1

Частота нестабильных ХА и количество радиочувствительных доноров

Показатель	Исходный уровень (533 человека)	Группа (число доноров)		
		0,5 Гр (108 человек)	1 Гр (33 человека)	2 Гр (33 человека)
Обменные аберрации на 100 клеток, *M* ± *SD*	0,23 ± 0,57	0,44 ± 0,66	12,97 ± 4,76	49,45 ± 17,96
90%	1,00	1,05	18,00	61,2
Количество радиочувствительных доноров, абс. (%)	28 (5,2)	11 (10,2)	3 (9,1)	4 (12,1)
Женщины/мужчины	19/9	9/2	1/2	3/1
Возраст, лет	49–89	56–76	60–79	57–82
Дозы на ККМ, Гр	0,01–2,60	0,05–1,43	0,007–1,71	0,007–1,38

Таблица 2

Частота клеток с микроядрами (*M* ± *SD*) и показатели радиочувствительности у обследованных женщин

Показатель	Группа (число доноров, % от общего количества обследованных лиц)	
	Исходный уровень (388 человек, 61,3%)	1 Гр (294 человека)
M ± *SD*, ‰	18,83 ± 11,21	151,02 ± 44,76
90%	30	206,5
Количество радиочувствительных доноров, абс. (%)	37 (9,5)	29 (9,8)
Возраст, лет	51–88	54–79
Дозы на ККМ, Гр	0,01–2,78	0,06–1,96

Таблица 3

Частота клеток с микроядрами (*M* ± *SD*) и показатели радиочувствительности у обследованных мужчин

Показатель	Группа (число доноров, % от общего количества обследованных лиц)	
	Исходный уровень (245 человек, 38,7%)	1 Гр (203 человека)
M ± *SD*, ‰	14,41 ± 8,01	135,19 ± 37,1
90%	26,3	183,4
Количество радиочувствительных доноров, абс. (%)	24 (9,8)	20 (9,8)
Возраст, лет	54–84	55–73
Дозы на ККМ, Гр	0,01–1,46	0,08–1,53

Результаты исследования по оценке радиочувствительных лиц на основе радиобиологического ответа Т-клеток с использованием анализа метафазных хромосом и оценки частоты цитокинез-блокированных лимфоцитов с МЯ позволяют сделать следующие выводы:

– радиочувствительность проявляется у небольшой части доноров;

– оба использованных цитогенетических метода показали свою эффективность;

– на показатели радиочувствительности не влияли возраст обследованных лиц, накопленная доза на ККМ; повышенный радиобиологический ответ отмечали чаще у женщин;

– при исследовании метафазных хромосом только один донор показал повышенную радиочувствительность одновременно в двух тестах.

Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенный спонтанный уровень повреждений ДНК может не ассоциироваться с повышенной индуцированной *in vitro* радиочувствительностью клеток. При облучении в дозах 0,5; 1 и 2 Гр радиочувствительность клеток проявилась у разных доноров (за исключением одного). Можно предположить, что чувствительность к облучению клеток и тканей организма обусловлена индивидуальными неспецифическими реакциями на стрессовые воздействия, на что влияют структурные особенности генов, а также изменения в экспрессии генов в момент облучения или после. Более того, наши данные подтверждают суждение о том, что на основании результатов, полученных в эксперименте *in vitro,* нельзя в полной мере спрогнозировать ситуацию в условиях воздействия *in vivo* [5, 6].

Дальнейшие исследования важно направить на решение следующих вопросов: воспроизводится ли радиочувствительность во времени, каковы механизмы радиочувствительности, какова роль структурных особенностей и регуляции генома в реализации клеточного ответа.

Работа выполнена частично в рамках федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы», поддержана Федеральным медико-биологическим агентством России.

Литература

1. International Atomic Energy Agency Technical Reports Series № 405, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment: a Manual. 2011. P. 30–45.
2. *Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O., Akleyev A.V.* Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure // Mutat. Res. 2013. V. 756, № 1–2. P. 115–118.
3. *Ахмадуллина Ю.Р.* Радиочувствительность Т-лимфоцитов периферической крови у потомков первого поколения, отцы которых подверглись хроническому радиационному воздействию: автореф. дис. … канд. биол. наук. М., 2014.
4. *Glantz S.A.* Primer of Biostatistics. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1997.
5. *Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Веснина И.Н. и др.* Анализ генотипической зависимости частот хромосомных аберраций в лимфоцитах человека при облучении *in vivo* и *in vitro* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50, № 3. С. 340–344.
6. *Rubanovich A.V., Khromov-Borisov N.N.* Genetic risk assessment of the joint effect of several genes: critical appraisal // Russ. J. Genet. 2016. V. 52, № 7. P. 757–769.

ДИАГНОСТИКА РЕДКИХ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ

Т.А. Гайнер[1, 2], О.Г. Каримова[1, 2], С.В. Хрестина[1], О.Л. Корень[3], Т.В. Карамышева[4], Н.Б. Рубцов[4], А.Д. Черемных[5], С.А. Васильев[5], Н.А. Скрябин[5], М.Е. Лопаткина[5], Л.П. Назаренко[5], И.Н. Лебедев[5]

[1] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
[2] Центр новых медицинских технологий, г. Новосибирск
[3] ЦСМ «Здравица», г. Новосибирск
[4] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
[5] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Цитогенетическая диагностика, проведенная с помощью GTG-окрашивания хромосом, в случае выявления сложной хромосомной перестройки не всегда позволяет поставить окончательный диагноз. Уточнить кариотип пациента и дать ему обоснованный медико-генетический прогноз возможно с привлечением комплекса методов молекулярно-цитогенетического и (или) молекулярно-генетического анализа. Представлены примеры проведения диагностики нескольких случаев редких хромосомных аномалий.

Случай 1. Четырехлетняя девочка с врожденной энцефалопатией неуточненной этиологии. Первичный цитогенетический анализ выявил редкое сочетание двух реципрокных транслокаций. Кариотип ребенка: 46,XX,t(1;7)(p22;q34),t(5;14)(p13;q13) *de novo* (рис. 1). Кариотипы родителей девочки нормальные.

Ввиду обнаруженной сочетанной аномалии и с учетом имеющихся у ребенка клинических проявлений было рекомендовано проведение молекулярных исследований. В НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (г. Томск) с помощью метода aCGH на ДНК-микрочипах у девочки была выявлена интерстициальная микроделеция 7q35q36.1 размером 2,8 Mb. Таким образом, с помощью микроматричного анализа был обнаружен хромосомный дисбаланс, который мог иметь клинические проявления. Далее с помощью мультицветной FISH было показано, что небольшой фрагмент 7q36.1qter, расположенный вслед за делетированным участком, оказался транслоцирован на короткое плечо 2 хромосомы. Соответственно, субтеломерный регион 2p был транслоцирован на короткое плечо хромосомы 1, что было подтверждено с помощью FISH.

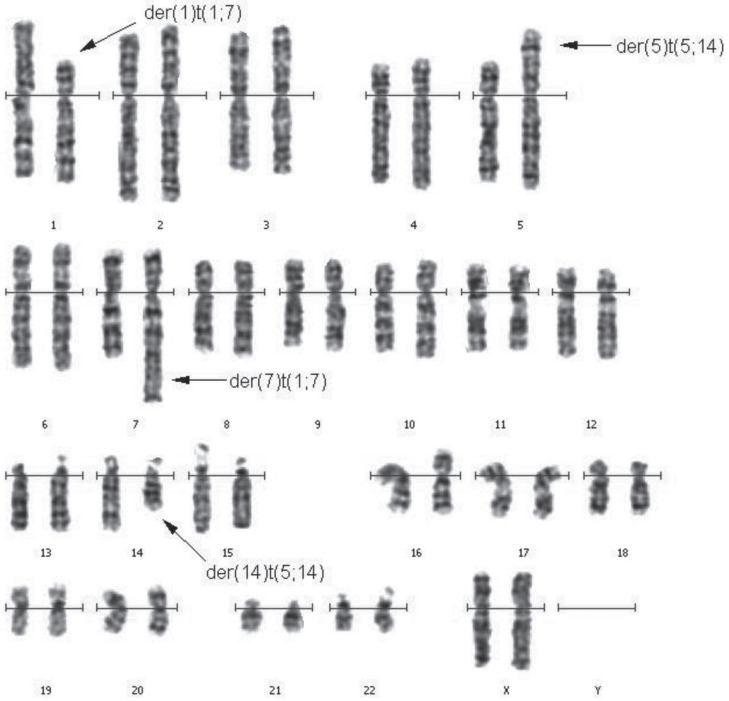


Рис. 1. Кариограмма пациентки (случай 1). GTG-дифференциальное окрашивание

Случай 2. Мужчина с диагнозом «бесплодие». При кариотипировании с использованием GTG-окрашивания была обнаружена транслокация с вовлечением трех хромосом. Кариотип: 46,XY,t(4;17;12)(p15.1;q25;q12) (рис. 2). Кроме того, анализ прометафазных хромосом показал, что в фрагменте, транслоцированном с хромосомы 4 на хромосому 17, с большой вероятностью присутствует парацентрическая инверсия в пределах двух бэндов. Поскольку подобные инверсии, как правило, не имеют клинического проявления, проведение молекулярно-цитогенетической диагностики в данном случае не требовалось. Пациенту рекомендована преимплантационная генетическая диагностика или использование донорской спермы при проведении ЭКО.

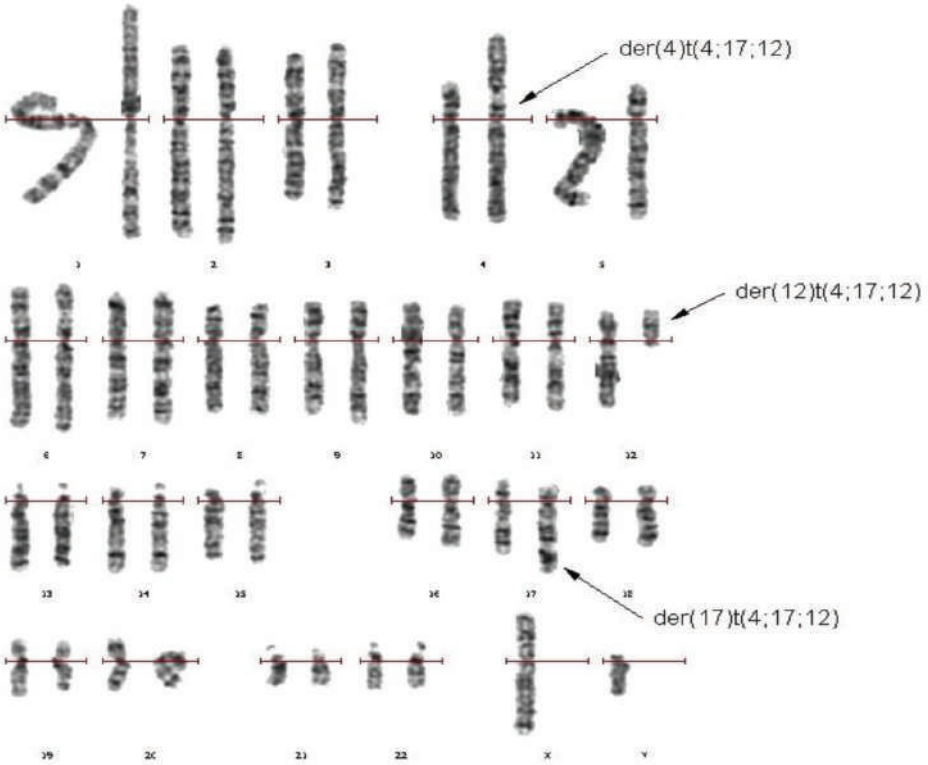


Рис. 2. Кариограмма пациента (случай 2). GTG-дифференциальное окрашивание

Случай 3. Женщина с вторичным бесплодием и тремя неразвивающимися беременностями в анамнезе. При кариотипировании с использованием GTG- и CBG-окрашиваний была выявлена транслокация с участием трех хромосом. Кариотип: 46,XX,t(3;16;5)(q25;q21;p15.1) (рис. 3). В транслокацию были вовлечены небольшие хромосомные районы, размер плеч дериватных хромосом почти не изменился. При анализе хромосом высокого уровня разрешения окрашивания (850 бэндов) возникло предположение, что имеет место еще более сложная хромосомная перестройка. Проведенное в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) молекулярно-цитогенетическое исследование с помощью трехцветной FISH показало, что небольшой фрагмент хромосомы 3 транслоцирован на хромосому 5 (рис. 4). Это было подтверждено с помощью двухцветной FISH. Таким образом, дериватная хромосома 5 состоит из материала трех хромосом – 3, 5 и 16.

При такой сложной перестройке шанс получить у пациентки гаметы без хромосомного дисбаланса крайне мал, поэтому ей было рекомендовано ЭКО с использованием донорской яйцеклетки.

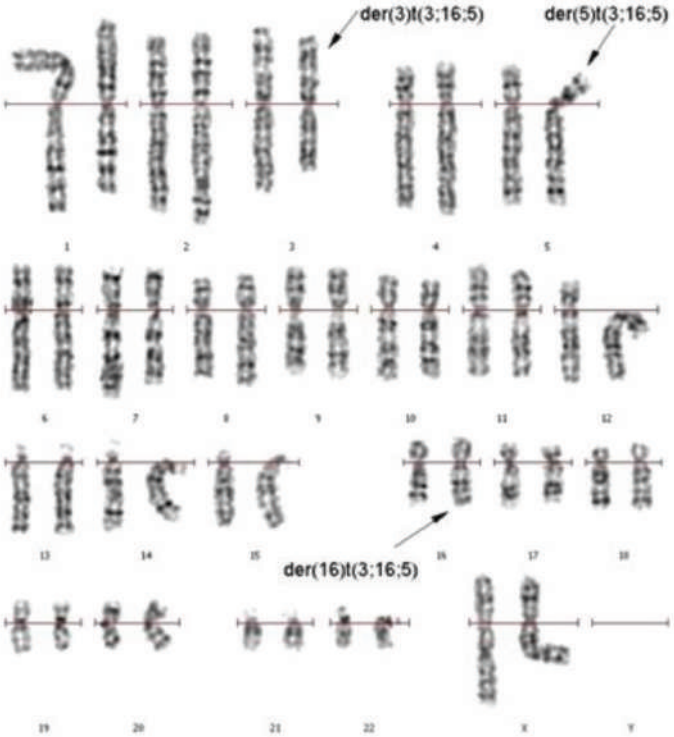


Рис. 3. Кариограмма пациентки (случай 3). GTG-дифференциальное окрашивание

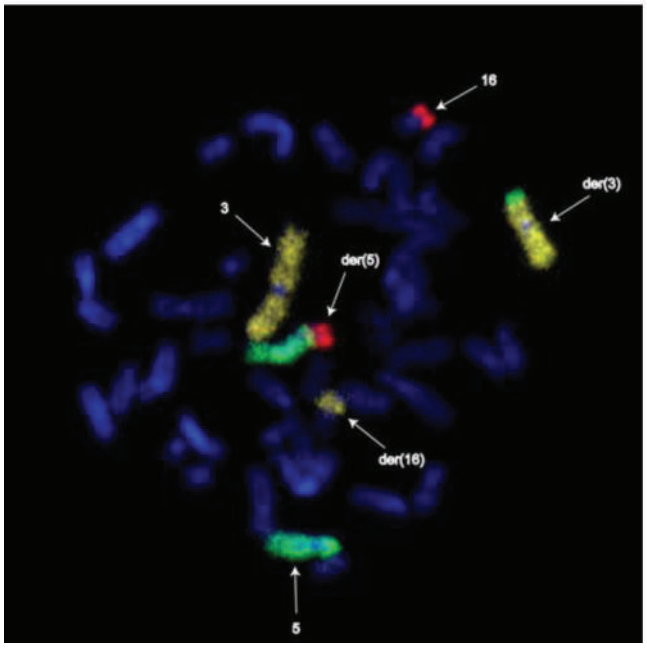


Рис. 4. FISH ДНК-проб WCP 3 (желтый), PCP16_4 (красный), WCP 5 (зеленый) с метафазными хромосомами пациентки (случай 3)

Таким образом, применение комплекса современных методов молекулярно-цитогенетического анализа позволяет более точно описать кариотип пациента и уточнить заключения, сделанные на основании анализа дифференциального окрашивания хромосом.

Работа частично проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЯДЕРНОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

М.В. Голубенко[1, 2], А.В. Марков[1], А.А. Зарубин[1], А.А. Слепцов[1], Р.Р. Салахов[1], Н.В. Тарасенко[1], А.Н. Казанцев[2], Ю.А. Королёва[1], М.С. Назаренко[1, 2], О.Л. Барбараш[2], В.П. Пузырёв[1]

[1] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск*

[2] *Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово*

Функционирование митохондриальной ДНК (мтДНК) находится под контролем ядерного генома, в том числе за счет изменения экспрессии кодируемых ядром белков, ответственных за процессы репликации мтДНК, ее транскрипции и работу трансляционного аппарата в митохондриях. Эпигенетические модификации ДНК позволяют динамически регулировать функциональное состояние генома в ответ на внешние факторы и на изменения внутри организма. В патогенезе заболеваний сердечно-сосудистого континуума существенную роль играет окислительный стресс, к числу последствий которого относятся повреждения митохондриального генома, приводящие к дисфункции митохондрий. Изучение взаимосвязи эпигенетических изменений в ядре и митохондриях необходимо для понимания механизмов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний.

С **целью** изучения связи эпигенетических характеристик митохондриального и ядерного геномов нами было проведено исследование эпигенетического профиля регуляторных участков митохондриальной ДНК (области D-петли) и трех ядерных генов, функционально связанных с митохондриями: *POLG* (митохондриальная ДНК-полимераза), *TFAM* (митохондриальный фактор транскрипции А) и *PPARGC1A* (альфа-субъединица коактиватора, гамма-рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором).

Материалом для исследования послужили лейкоциты и атеросклеротически пораженные сонные артерии пациентов, имевших показания к каротидной эндартерэктомии (40 человек), а также лейкоциты индивидов без проявлений атеросклероза сонных артерий (контрольная группа, 12 человек). Обследование пациентов и сбор материала были проведены в НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово). Контрольная группа была сформирована из банка ДНК НИИ медицинской генетики (г. Томск). Средний возраст в выборке больных составил (63 ± 7) лет, в контрольной группе – (64 ± 7) лет, в обеих выборках было 40% женщин и 60% мужчин.

Определение уровня метилирования было проведено с помощью высокопроизводительного бисульфитного секвенирования: после обработки геномной ДНК бисульфитом натрия исследуемые участки генов были амплифицированы с помощью ПЦР, и полученные ПЦР-продукты использовали для приготовления ПЦР-библиотек. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina). Уровень метилирования оценивали как отношение числа цитозинов, выявленных в CpG-сайтах, к общему числу прочтений в этих позициях: C/(C+T). Кроме того, было проведено генотипирование мтДНК (определение гаплогрупп мтДНК с помощью секвенирования гипервариабельного сегмента D-петли и рестрикционного анализа) и генотипирование вариантов в ядерных генах, изменяющих аминокислотную последовательность кодируемых белков: indel rs41550117 (полиглутаминовый повтор, *POLG*); rs1937:G>C (Ser12Thr, *TFAM*). Для статистического анализа использовали непараметрические методы (критерий Манна – Уитни, коэффициент корреляции Спирмена).

Согласно полученным результатам, в лейкоцитах и атеросклеротически пораженных сонных артериях пациентов по уровню метилирования исследуемые локусы можно разделить на две группы. D-петля мтДНК и начало гена (часть промотора и экзона 1) *TFAM* имеют очень низкий уровень метилирования, составляющий в среднем менее 1% (таблица). С другой стороны, промотор гена *PPARGC1* и участок экзона 2 гена *POLG*, который играет важную роль в регуляции экспрессии гена [1], имеют средний и высокий уровень метилирования в CpG-сайтах, который существенно меняется на протяжении исследованных регионов. В гене *POLG* уровень метилирования в нетранслируемой части экзона составлял около 40–60%, а затем повышался и достигал 100% в некоторых CpG-сайтах. В промоторе гена *PPARGC1A* уровень метилирования снижался ближе к началу экзона.

Сравнение среднего уровня метилирования по всем сайтам в исследованных регионах между группами образцов (лейкоциты пациентов, атеросклеротические бляшки сонных артерий, лейкоциты индивидов контрольной группы) выявило статистически значимые различия: уровень метилирования в генах *PPARGC1A* и *POLG* был ниже в ДНК, выделенной из атеросклеротических бляшек, по сравнению с лейкоцитами пациентов. Различия в уровне метилирования D-петли мтДНК между бляшками и лейкоцитами также были статистически значимыми (p = 0,03), несмотря на небольшую разницу абсолютных значений.

Средний уровень метилирования исследованных локусов (%)

Локус	Число CpG-сайтов	Пациенты с атеросклерозом сонных артерий		Контрольная группа
		Атеросклеротические бляшки	Лейкоциты	Лейкоциты
мтДНК	18	0,90* (0,62–1,66)	0,73 (0,52–0,86)	1,39** (1,08–4,02)
TFAM	40	0,53 (0,45–1,32)	0,54 (0,43–0,87)	0,62 (0,50–1,68)
POLG	43	74,53** (70,12–77,27)	86,68 (85,58–88,12)	87,40 (85,42–88,67)
PPARGC1A	12	13,40** (10,27–16,86)	26,55 (23,46–29,18)	26,47 (23,18–30,02)

Примечание. Приведены значения медианы среднего по локусу уровня метилирования, в скобках – первый и третий квартили. Звездочками отмечены статистически значимые различия (критерий Манна – Уитни) по сравнению с лейкоцитами пациентов: * $p < 0,05$; ** $p < 10^{-4}$.

Уровень метилирования D-петли был выше в лейкоцитах индивидов контрольной группы по сравнению с лейкоцитами пациентов с атеросклерозом. Для уровня метилирования гена *TFAM* не было выявлено статистически значимых различий между выборками.

Сравнение показателей метилирования в зависимости от генотипа мтДНК и исследованных ядерных генов выявило несколько более низкий уровень метилирования в гене *POLG* у индивидов, в генотипе которых присутствовал аллель с числом CAG-повторов, отличным от 10, – 85,57%, по сравнению с 87,25% у лиц с генотипом 10/10 ($p = 0,03$). Эта ассоциация была особенно выражена для CpG-сайта, расположенного прямо перед областью CAG-повторов в геномной позиции chr15:89333631 (GRCh38/hg38), где снижение метилирования у носителей редких аллелей прослеживалось как в клетках крови ($p = 0,000001$), так и в бляшках ($p = 0,002$). Известно, что в экспериментах на культурах клеток было выявлено увеличение уровня экспрессии гена *POLG* при уменьшении числа CAG-повторов [2]. Изменение характера метилирования этого региона может быть механизмом, обеспечивающим увеличение экспрессии гена, связанное с изменчивостью числа повторов.

Таким образом, нами выявлены тканеспецифичные и генотип-специфичные изменения уровня метилирования регуляторных регионов мтДНК и ядерных генов, важных для функционирования митохондриального генома. Наблюдаемое разделение исследованных локусов на две группы по уровню метилирования можно связать с их функцией. Ген *TFAM* кодирует митохондриальный транскрипционный фактор, а D-петля мтДНК является регуляторным регионом как для транскрипции, так и для репликации мтДНК. Функция этих локусов связана с экспрессией митохондриальных генов, и для них характерен очень низкий уровень метилирования во всех исследованных образцах. Ген *PPARGC1A* кодирует регуляторный фактор, стимулирующий в том числе биогенез митохондрий; а ген *POLG* кодирует каталитическую субъединицу митохондриальной ДНК-полимеразы (гамма). Таким образом, функция этих генов связана в основном с «делением» митохондрий и репликацией мтДНК. Мы выявили снижение уровня метилирования этих локусов в образцах ДНК из атеросклеротических бляшек по сравнению с лейкоцитами, и это может свидетельствовать о более интенсивном биогенезе митохондрий и репликации мтДНК в атеросклеротических бляшках. Выявленные различия могут отражать тканеспецифичные различия уровня метилирования, однако в то же время они могут представлять собой компенсаторный ответ генома на повышенный уровень окислительного стресса, характерный для процесса атерогенеза в тканях сосудистой стенки.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Kelly D.R.W., Mahmud A., McKenzie M. et al.* Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40, № 20. P. 10124–10138.
2. *Spelbrink J.L., Toivonen J.M., Hakkaart G.A.J. et al. In vivo* functional analysis of the human mitochondrial DNA polymerase *POLG* expressed in cultured human cells // J. Biol. Chem. 2000. V. 275, № 32. P. 24818–24828.

ПОИСК ГЕНОВ ДИСТРОПИИ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Д.Е. Гомбоева[1], О.В. Сайк[2], Е.Ю. Брагина[1], А.В. Марков[1], В.А. Иванисенко[2], М.С. Назаренко[1], В.П. Пузырёв[1]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Актуальность. Многие эпидемиологические исследования демонстрируют снижение числа онкологических заболеваний (ОЗ) среди пациентов с болезнью Гентингтона (БГ) [1]. Такое редкое совместное фенотипическое проявление двух заболеваний у одного индивида называется обратной коморбидностью, или дистропией [2]. В отдельных исследованиях отмечают влияние экспансии CAG-повторов в первом экзоне гена *HTT* (4p16.3) на развитие дистропии БГ и ОЗ [3, 4], однако молекулярная природа этого феномена остается неизученной.

Нарушение ключевых процессов апоптоза, благодаря которому осуществляется поддержание клеточного гомеостаза, приводит к развитию и прогрессии

онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Процесс нейродегенерации сопровождается повышенной активацией апоптоза, в то время как канцерогенез характеризуется угнетением апоптоза [5]. В связи с этим выявление генов, вовлеченных в апоптоз, и изучение их эпигенетической регуляции представляется перспективным для поиска возможного механизма обратной коморбидности БГ и ОЗ.

Материал и методы. Список ключевых генов был получен в результате реконструкции генных сетей, связанных с апоптозом, БГ и канцерогенезом, с использованием инструмента ANDSystem [6] и последующего анализа, основанного на определении центральных участников сетей (по показателю центральности по посредничеству) и участников регуляторных взаимодействий. Для выявленных генов выполнен поиск наличия/отсутствия CpG-островков в промоторных регионах с использованием геномного браузера UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu/index.html). Для анализа и функциональной аннотации генов использовали ресурс Gene Ontology (http://geneontology.org). Статистически значимыми считались значения $p < 0,05$ с учетом поправки Бонферрони.

Результаты. В результате реконструкции и анализа генных сетей идентифицировано 30 ключевых генов, связанных с апоптозом, БГ и канцерогенезом, включая *GLS2*, *TYMS*, *CCL5*, *UCP2*, *SNAP25*, *KHDRBS1*, *NTS*, *GRIA2*, *CASP6*, *SETDB1*, *NFKB1*, *SIRT1*, *PSEN1*, *CA9, BCL11B*, *BDNF*, *NGFR*, *MCL1*, *TGM2*, *NTRK2*, *HTT*, *TP53*, *TNF*, *HSPA4*, *IL6*, *SP1*, *INS*, *SQSTM1*, *HDAC1*, *CASP3*.

Помимо регуляции апоптотического процесса наиболее значимыми биологическими процессами, в которые вовлечены выявленные гены, являются позитивная регуляция клеточных взаимодействий, позитивная регуляция передачи сигналов, регуляция пролиферации клеточной популяции, позитивная регуляция генной экспрессии, регуляция клеточных процессов ($p < 0,05$). Среди молекулярных функций, ассоциированных с исследуемыми генами, сверхпредставлены такие функции, как связывание белков, специфическое связывание с последовательностью дистального энхансера РНК-полимеразы II, активность лиганда рецептора, активность регулятора рецептора, связывание сигнального рецептора, специфическое связывание белковых доменов, связывание идентичных белков ($p < 0,05$).

Роль некоторых из идентифицированных генов (например, *HDAC1*, *SETDB1*, *BCL11B* и *TP53*) в канцерогенезе неоднозначна: они могут выступать как онкосупрессоры на ранних стадиях развития опухоли и как онкогены на более поздних этапах. Среди выявленных генов, регулирующих апоптоз, гены *TP53*, *SP1* и *HDAC1* взаимодействуют с белком гентингтином и могут вовлекаться в гентингтин-опосредованные процессы активации/подавления канцерогенеза.

В результате анализа промоторных регионов для 22 (*KHDRBS1*, *HDAC1*, *MCL1*, *SETDB1*, *HTT*, *NFKB1*, *CASP3*, *GRIA2*, *HSPA4*, *SQSTM1*, *NTRK2*, *SIRT1*, *UCP2*, *BDNF*, *GLS2*, *SP1*, *PSEN1*, *BCL11B*, *TP53*, *NGFR*, *TYMS*, *TGM2*) из 30 исследуемых генов идентифицированы промоторные CpG-островки. Эти гены могут представлять интерес для дальнейшего исследования, поскольку аберрантное метилирование генов, регулирующих апоптоз, а также онкогенов и генов супрессоров опухолей, может реализовать механизм обратной коморбидности.

Заключение. Таким образом, в исследовании выявлены гены, приоритетные для дальнейшего изучения значимости их эпигенетических модификаций в отношении дистропии онкологических заболеваний и болезни Гентингтона.

Исследование осуществляется при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00391 «Эпигенетические механизмы супрессии опухолевого процесса при болезни Гентингтона» и комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН II.1 «Реконструкция, компьютерный анализ и моделирование структурно-функциональной организации биомедицински значимых генных сетей».

Литература

1. *McNulty P., Pilcher R., Ramesh R. et al.* Reduced cancer incidence in Huntington's disease: analysis in the Registry study // J. Huntington's Dis. 2018. V. 7. P. 209–222.
2. *Пузырёв В.П.* Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии человека // Мед. генетика. 2008. № 9. С. 3–9.
3. *Thion S.T., Humbert S.* Cancer: from wild-type to mutant huntingtin // J. Huntington's Dis. 2018. V. 7. P. 201–208.
4. *Murmann A.E., Gao Q.Q., Putzbach W.E. et al.* Small interfering RNAs based on huntingtin trinucleotide repeats are highly toxic to cancer cells // EMBO Rep. 2018. V. 19 (3). P. e45336.
5. *Driver J.* Understanding the link between cancer and neurodegeneration // J. Geriatr. Oncol. 2012. V. 3, Is. 1. P. 58–67.
6. *Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V. et al.* ANDSystem: an associative network discovery system for automated literature mining in the field of biology // BMC Sist. Biol. 2015. V. 9, Suppl. 2. P. S2.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КОМОРБИДНОСТИ БОЛЕЗНЕЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО КОНТИНУУМА

И.А. Гончарова[1, 2], М.С. Назаренко[1, 2], А.В. Марков[1], Н.В. Тарасенко[1], Т.Б. Печерина[2], В.В. Кашталап[2], А.В. Понасенко[2], О.Л. Барбараш[2], В.П. Пузырёв[1]

[1] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск*

[2] *Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово*

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одним из заболеваний, входящих в состав сердечно-сосудистого континуума (ССК), основными пусковыми механизмами которого являются повышенный уровень холестерина, артериальная гипертензия и сахарный диабет второго типа. Данные патологии могут присутствовать в различных сочетаниях у пациентов, образуя состояния, характеризующиеся

разным индексом коморбидности. Развитие различных форм сочетанной патологии определяется воздействием множества факторов, в основе которых лежит генетический статус пациента, определяющий специфический ответ организма и приводящий к активации различных сигнальных путей и физиологических процессов.

Цель настоящего исследования заключалась в характеристике генетической структуры подверженности коморбидным состояниям у больных ИБС.

Материал и методы. В исследование были включены больные ИБС (746 человек), госпитализированные в кардиологическое отделение с острым коронарным синдромом (ОКС) или для проведения аортокоронарного шунтирования (АКШ). Среди них – 552 мужчины (средний возраст (58,6 ± 8,3) года) и 194 женщины (средний возраст (62,4 ± 8,7) года). Группа больных была сформирована на базе Регистра ОКС 2008, 2010, 2014 гг. и Регистра АКШ в НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний г. Кемерово.

Для изучения генетических основ коморбидных состояний при ИБС выборка больных с инфарктом миокарда (ИМ) была разделена на подгруппы в зависимости от наличия/отсутствия сочетанных заболеваний сердечно-сосудистого континуума (артериальная гипертензия (АГ), гиперлипидемия (ГЛП) и сахарный диабет второго типа (СД2)). На основании этого были сформированы следующие подгруппы: больные с ИМ без сопутствующих патологий (данная подгруппа была обозначена как «только ИМ», 116 человек); больные с ИМ и АГ, но без ГЛП и СД2 (ИМ + АГ, 166 человек); больные с ИМ, АГ, ГЛП, но без СД2 (ИМ + АГ + ГЛП, 104 человека); больные с ИМ, АГ, ГЛП и СД2 (данная подгруппа обозначена как «синтропия сердечно-сосудистого континуума», 108 человек). В качестве контрольной группы была использована популяционная выборка жителей Сибирского региона (285 человек), включающая 155 (54,4%) мужчин и 130 (46,6%) женщин (средний возраст (56,7 ± 10,1) года). По этнической принадлежности все обследованные индивиды являлись русскими.

Для выполнения исследования было использовано 48 однонуклеотидных маркеров (SNP), локализованных в генах, белковые продукты которых вовлечены в различные сигнальные и метаболические пути. Генотипирование выполнялось с помощью масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY® (США). Для статистического анализа данных применяли следующее программное обеспечение: Statistica v. 8.0 (StatSoft Inc, США) и среда R с применением пакетов stats и genetics. Статистические гипотезы при сравнительном анализе данных проверяли на 5%-м уровне значимости.

Результаты и обсуждение. При разделении группы больных с ИМ на подгруппы в зависимости от наличия сочетанных заболеваний, таких как АГ, ГЛП и СД2, было показано, что индекс коморбидности (число сочетанных заболеваний на одного человека) и средний возраст пациентов имеют прямопропорциональную зависимость, а соотношение мужчин и женщин изменяется в обратном порядке. В группах «только ИМ» и «синтропия ССК» средний возраст составил (56,7 ± 8,3) и (60,5 ± 8,8) года (p = 0,0013), а соотношение мужчин и женщин – 5,54 (105/11) и 0,86 (50/58) ($p = 0{,}1 \cdot 10^{-8}$) соответственно.

В связи с этим был проведен поиск гендерных особенностей формирования предрасположенности к развитию изучаемых клинических фенотипов. Для этого в каждой из подгрупп выполнено сравнение частот аллелей и генотипов между мужчинами и женщинами. В результате выявлены различия в частотах аллелей следующих генов: в подгруппе с фенотипом «только ИМ» – для генов DEAD-бокс геликазы 5 (*DDX5* (rs1991401)) и аквапорина 2 (*AQP2* (rs2878771)); у больных с ИМ и АГ – для гена кератина 19 (*KRT19* (rs56051972)); в группе «синтропия ССК» – для гена *CD247* (rs6668182). В группе с ИМ, АГ и ГЛП между мужчинами и женщинами не было статистически значимых различий по частотам аллелей полиморфных вариантов изученных генов. Полиморфные варианты генов, различающиеся по частотам аллелей и генотипов между мужчинами и женщинами в изучаемых выборках, были исключены из дальнейшего анализа.

При анализе структуры генетической подверженности к изученным клиническим фенотипам установлено, что с ИБС ассоциированы полиморфные варианты генов интегрина бета 5 – *ITGB5* (rs1007856), интегрина альфа 4 – *ITGA4* (rs1143674), некодирующей антисмысловой РНК гена *CDKN2B* – *CDKN2BAS1* (rs1333049), протеина межклеточных взаимодействий, ассоциированного с кадгерином 5, – *KIAA1462* (rs3739998, современная аббревиатура гена – *JCAD*) и АДАМ-подобного дицеклина – *ADAMDEC1* (rs3765124); с фенотипом «только ИМ» – полиморфные варианты генов *JCAD*, *ADAMDEC1*, мембранно-ассоциированного иммуноглобулина альфа – *CD79A* (rs3810153) и ДНК-метилтрансферазы 3А – *DNMT3A* (rs7590760); с сочетанием ИМ и АГ ассоциированы варианты генов *ITGB5*, *ITGA4*, *CDKN2BAS1* и *ADAMDEC1*; с ИМ + АГ + ГЛП связаны полиморфные варианты генов *ITGB5*, *CDKN2BAS1*, *ADAMDEC1*, а также генов рецептора серотонина 5-HT подтипа 3B – *HTR3B* (rs4938056) и синтаксин-связывающего белка 5 – *STXBP5L* (rs17740066); с «синтропией» ассоциированы варианты генов *JCAD*, триггерного рецептора миелоидных клеток 1-го типа – *TREM1* (rs1817537), альфа-цепи коллагена первого типа – *COL1A1* (rs2075555), тканевого ингибитора металлопротеиназ 2 – *TIMP2* (rs2277698), рецептора липопротеинов низкой плотности – *LDLR* (rs2738446).

Среди генов, полиморфные варианты которых показали ассоциации с изученными клиническими фенотипами, выявлены как общие, так и специфические гены. К общим относятся гены *JCAD*, *CDKN2BAS1*, *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *ITGA4*, показавшие ассоциации с несколькими патологическими состояниями. Данные гены определяют подверженность к ИБС в целом и в разной степени ассоциированы со всеми изученными коморбидными состояниями. Общие гены кодируют белки, в основном относящиеся к таким биологическим процессам, как организация экстрацеллюлярного матрикса (GO:0043062) и ответ на стимулы (GO:0050896). Зарегистрированные ассоциации однотипны, то есть для всех групп «патологическими» являются одни и те же аллели и генотипы. Размер эффекта изученных

SNP, эквивалентный отношению шансов (*OR*), варьировал от 1,52 для *ITGB5* (rs1007856) в общей группе ИБС до 2,49 для *JCAD* (rs3739998) в группе «синтропия» ССК. Функциональная аннотация показала, что ассоциированные SNP «общих» генов являются регуляторными и влияют на экспрессию генов на транскрипционном или посттранскрипционном уровнях: eQTL локусы (*ITGB5* (rs1007856), *ADAMDEC1* (rs3765124), *JCAD* (rs3739998), *CDKN2BAS1* (rs1333049)); участки связывания с мРНК белков, осуществляющих посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов (*ITGA4* (rs1143674), *ADAMDEC1* (rs3765124), *JCAD* (rs3739998)) (https://gtexportal.org/; http://rsnp.psych.ac.cn).

Специфические гены выявлены для всех изученных патологий, за исключением сочетания ИМ и АГ. Подверженность к данному фенотипу определяется только «общими» генами. Специфическими для больных с фенотипом «только ИМ» являются гены *CD79A* и *DNMT3A*, продукты которых участвуют в формировании адаптивного иммунного ответа (GO:0002250), обеспечивают метилирование ДНК (GO:0006306) и регуляцию генной экспрессии (GO:0010468). Для группы больных с сочетанием ИМ + АГ + ГЛП специфическими являются гены *HTR3B* и *STXBP5L*, входящие в кластер генов, кодирующих серотониновые рецепторы (GO:0007210), и белки, обеспечивающие экзоцитоз (GO:0006887). Для группы «синтропия ССК» специфическими являются гены *COL1A1* и *TIMP2*, белковые продукты которых обеспечивают организацию экстрацеллюлярного матрикса, ген *LDLR,* отвечающий за метаболизм липидов, а также ген *TREM1*, относящийся к кластеру генов, кодирующих белки, ответственные за формирование врожденного иммунного ответа (GO:0045087).

Заключение. Таким образом, индекс коморбидности инфаркта миокарда, артериальной гипертензии, гиперлипидемии и сахарного диабета второго типа зависит от возраста и пола пациентов с ИБС. Генетическая структура подверженности данных коморбидных состояний у больных ИБС различается. В формирование коморбидности болезней сердечно-сосудистого континуума вовлечены многие биологические процессы, ключевыми из которых являются метаболизм экстрацеллюлярного матрикса, регуляция функционирования эндотелия и ангиогенеза, клеточной пролиферации и апоптоза, то есть молекулярных процессов, действующих на уровне сосудистой стенки.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

КОРРЕКЦИЯ КРУПНЫХ ХРОМОСОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

М.М. Гридина[1], П.А. Орлова[2], Т.В. Никитина[3], А.А. Кашеварова[3], А.Н. Кораблев[1], А.Г. Мензоров[1], К.Е. Орищенко[1], И.Н. Лебедев[3], О.Л. Серов[1]

[1] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
[2] Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск
[3] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Широкое применение метода сравнительной геномной гибридизации (aCGH) выявило высокую частоту структурных вариаций генома (copy number variation (CNV)) в популяциях человека. Зачастую именно CNV являются причиной различных наследственных патологий. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с последующей их дифференцировкой *in vitro* дает потенциальную возможность применения ИПСК в регенеративной медицине. Таким образом, представляется важной разработка методов коррекции масштабных хромосомных перестроек в ИПСК.

В качестве модели для разработки такого метода мы выбрали ИПСК, полученные из фибробластов биоптата кожи пациента с недифференцированной умственной отсталостью, в геноме которого была обнаружена микродупликация размером 0,94 Mb в районе 3p26.3, затрагивающая единственный ген – *CNTN6*, кодирующий белок контактин-6. Перестройки дистального участка хромосомы 3, как делеции, так и дупликации, вызывают разнообразные неврологические, нейропсихические и нередко дисморфозные нарушения (микроцефалия, гидроцефалия, аномалии лицевой части черепа и др.), а также заболевания аутистического спектра.

Мы разработали две стратегии для коррекции данной хромосомной перестройки в ИПСК с использованием технологии направленного редактирования генома CRISPR/Cas9. Согласно первой стратегии, мы планировали замкнуть в кольцо хромосому 3, несущую перестройку. В дальнейшем при культивировании полученных ИПСК мы ожидали потери дефектной кольцевой хромосомы. В качестве второго подхода мы встраивали LoxP сайты в геном ИПСК по границам одного из дуплицированных участков. После обработки полученных клеток cre-рекомбиназой мы получили удаление одной из дуплицированных копий. В результате проведена коррекция числа копий гена *CNTN6*, что позволяет получать нейроны *in vitro* из ИПСК с нормализованным кариотипом.

Таким образом, мы предложили и сравнили две различные стратегии для коррекции масштабных хромосомных перестроек в ИПСК и показали эффективность использования технологии LoxP-cre.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10231.

СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА КЛАСТОГЕННЫЕ И АНЕУГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ И БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТАХ

В.Г. Дружинин[1], Е.Д. Баранова[1], В.Ю. Буслаев[1], В.П. Волобаев[1], Т.А. Головина[1], Л.В. Мацкова[1, 2], А.В. Мейер[1], А.О. Михайлова[1], Д.П. Шубенкина[1]

[1] Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия
[2] Каролинский институт, г. Стокгольм, Швеция

Последние достижения в развитии молекулярных методов исследования бактериальных геномов, в особенности использование методов секвенирования нового поколения, привели к пониманию значимости микробиома в поддержании здоровья, его влияния на развитие острых, хронических и неопластических заболеваний. В связи с этим одним из важных и пока малоизученных аспектов влияния микробиома является способность многих бактериальных видов индуцировать мутации или модулировать мутационный процесс в клетках организма хозяина [1]. В докладе обсуждаются разнообразие механизмов генотоксического действия отдельных представителей бактериальной микробиоты, включая прямое повреждение ДНК инфицированных клеток генотоксинами, индукцию окислительного стресса, иммунную модуляцию, задержку репликации и снижение эффективности репарации. Приводятся примеры исследований, указывающих на связь таксономического состава микробиома конкретных органов млекопитающих с уровнем генетических повреждений в их соматических клетках. Подчеркивается, что бактерии используют различные стратегии для обеспечения собственной выживаемости и репликации, в том числе путем подавления репарации ДНК клеток организма хозяина, способствуя выживаемости инфицированных клеток, несмотря на наличие в них повреждений ДНК. Таким образом, можно говорить о том, что индуцируемые микробиотой генотоксические эффекты являются своеобразным «побочным продуктом» реализации этих бактериальных стратегий в организме хозяина. Тем не менее такая «побочность» не умаляет той роли, которую играет мутагенез, индуцируемый и (или) модулируемый бактериями, входящими в состав микробиоты.

В докладе представлены пилотные результаты, полученные в рамках экспериментальной проверки собственной гипотезы о том, что чувствительность генома человека к генотоксическим и канцерогенным факторам, воздействующим на жителей угледобывающего промышленного региона, может зависеть от состава микробиоты респираторного тракта. Приводятся сведения о таксономическом составе микробиома верхних дыхательных путей и ассоциированные с ним генотоксические эффекты в соматических клетках (лимфоциты крови, буккальные эпителиоциты) здоровых доноров, первичных пациентов с раком легкого и угольных шахтеров с профессиональными пневмокониозами.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00022).

Литература

Druzhinin V.G., Matskova L.V., Fucic A. Induction and modulation of genotoxicity by the bacteriome in mammals // Mutat. Res. 2018. V. 776. P. 70–77.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА (*SNCA*) ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А.К. Емельянов[1, 2], А.О. Лавринова[1], Н.В. Мельникова[3], А.А. Дмитриев[3], И.В. Милюхина[2, 4], С.Н. Пчелина[1, 2]

[1] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина
[2] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург
[3] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва
[4] Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург

Болезнь Паркинсона (БП) является нейродегенеративным заболеванием, ассоциированным с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга, обусловленной агрегацией в них белка альфа-синуклеина (SNCA). К настоящему времени ряд исследований *in vitro* и на модельных животных показал, что увеличение экспрессии гена *SNCA* способствует формированию нейротоксических олигомерных форм альфа-синуклеина. Дупликация и трипликация гена *SNCA* приводит к развитию наследственных форм БП [1]. Можно предположить, что причиной увеличения уровня альфа-синуклеина в клетках, приводящее к формированию его нейротоксических агрегатов, может являться также нарушение эпигенетической регуляции экспрессии гена *SNCA*. Показано, что наиболее значимое влияние на уровень экспрессии гена *SNCA* может оказывать метилирование регуляторной области, расположенной в интроне 1 гена [2].

Целью настоящего исследования явилась оценка степени метилирования интрона 1 гена *SNCA*, экспрессии альфа-синуклеина (мРНК, белок)

в CD45+-клетках периферической крови пациентов с БП и контроля, а также влияния дофамина на данные показатели в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) *in vitro*.

CD45+-клетки были выделены из периферической крови 50 пациентов с БП (средний возраст (61,46 ± 9,04) года), не получающих Л-ДОФА-терапии, и 65 лиц контрольной группы (средний возраст (63,40 ± 8,85) года) в градиенте плотности раствора фиколла (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Великобритания) с последующей магнитной сепарацией (ручной сепаратор MACS (Miltenyi Biotec, США), колонки miniMACS типа MS (Miltenyi Biotec, США)).

В исследование *in vitro* было включено 20 образцов ЛПК пациентов с БП (средний возраст (63,65 ± 7,41) года), не принимающих Л-ДОФА-содержащие препараты, и 16 образцов ЛПК индивидуумов контрольной группы (средний возраст (62,5 ± 8,05) года). Проведено культивирование ЛПК в течение трех суток (5% CO_2, 37 ºС) в присутствии 100 мкМ гидрохлорида дофамина (ГД) (Sigma-Aldrich, США).

Оценка уровня мРНК гена *SNCA* проводилась с использованием ПЦР в режиме реального времени и красителя SYBR Green 1 (Bio-Rad, США). Исследование концентрации альфа-синуклеина проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора alpha-synuclein ELISA kit (Invitrogen, США). Бисульфитную конвертацию геномной ДНК (500 нг) проводили с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research, США). Бисульфитное секвенирование проводили с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500-cycles) (Illumina, США) на приборе MiSeq (Illumina, США).

Не было обнаружено статистически значимых различий при сравнении степени метилирования интрона 1 гена *SNCA* (p = 0,217), уровня мРНК гена *SNCA* (p = 0,457) и альфа-синуклеина (p = 0,064) в CD45+-клетках периферической крови пациентов с БП и контроля. При этом выявлена обратная корреляция степени метилирования CpG островков с концентрацией белка альфа-синуклеина (r = –0,392; p = 0,002; n = 62) и уровнем мРНК гена *SNCA* (r = –0,325; p = 0,05; n = 37) в CD45+ периферической крови индивидуумов контрольной группы, но не в группе пациентов с БП.

Обнаружены статистически значимые различия в уровне мРНК гена *SNCA* при сравнении клеток, обработанных и не обработанных ГД, как в случае группы пациентов с БП (p = 0,02), так и в контроле (p = 0,003). Была выявлена тенденция к уменьшению уровня альфа-синуклеина в лимфоцитах периферической крови индивидуумов контрольной группы при сравнении обработанных и не обработанных дофамином клеток (p = 0,068). Не выявлено изменения степени метилирования интрона 1 гена *SNCA* в ЛПК пациентов с БП и контроля вне зависимости от обработки клеток ГД (p > 0,05).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии ассоциации изменения степени метилирования интрона 1 гена *SNCA* с БП. Впервые показано влияние дофамина на уровень экспрессии гена *SNCA* в ЛПК пациентов с БП и контроля.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01187.

Литература

1. *Stefanis L., Emmanouilidou E., Pantazopoulou M. et al.* How is alpha-synuclein cleared from the cell? // Neurochem. 2019. V. 150 (5). P. 577–590.
2. *Jowaed A., Schmitt I., Kaut O., Wüllner U.* Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains // J. Neurosci. 2010. V. 30, № 18. P. 6355–6359.

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ АНЕУПЛОИДИЙ МЕТОДОМ aCGH

Д.И. Жигалина[1], Н.А. Скрябин[1], О.Р. Канбекова[1, 2], А.Н. Марошкина[3], Е.О. Чуркин[3], И.Н. Лебедев[1]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко, г. Томск
[3] Центр вспомогательных репродуктивных технологий Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск

В рамках стандартной процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) обычно получают несколько эмбрионов, в результате чего возникает необходимость определения их приоритета для переноса в полость матки. Ключевую роль в этом вопросе играют морфологические характеристики морул и бластоцист, однако хорошая морфология эмбрионов не позволяет исключить у них хромосомных нарушений [1, 2]. Анеуплоидии часто встречаются у эмбрионов человека на преимплантационном этапе развития и, вероятно, в значительной степени являются причиной высокой частоты неудач имплантации и ранней потери беременности у пациентов в циклах ЭКО [3–5]. Преимплантационный генетический скрининг (ПГС) методом микроматричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH) позволяет отбирать для переноса эмбрионы со сбалансированным набором хромосом. Помимо этого, результаты ПГС дают возможность получить представление о структуре хромосомных нарушений у эмбрионов на преимплантационном этапе развития.

Целью настоящего исследования стал ретроспективный анализ хромосомной конституции бластоцист человека, полученных в рамках циклов ЭКО с преимплантационным генетическим скринингом.

Материал и методы. Нами был проведен анализ молекулярных кариотипов 156 бластоцист, полученных в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения в период с 2017 по 2019 г. Бластоцисты были

получены от 65 женщин, средний возраст которых составил (36,6 ± 4,9) года. В шести семейных парах один из супругов являлся носителем сбалансированной транслокации. Биопсию клеток трофэктодермы проводили в г. Томске в Центре вспомогательных репродуктивных технологий Сибирского государственного медицинского университета и ОГАУЗ «Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко». Для полногеномной амплификации ДНК из клеток трофэктодермы был использован набор реактивов PicoPlex (Rubicon Genomics, США). Молекулярно-цитогенетический анализ образцов был проведен методом aCGH с использованием микрочипа GenetiSure Pre-Screen, 8×60K (Agilent Technologies, США). Для статистической обработки результатов был использован критерий χ^2 Пирсона.

Результаты. Эффективность полногеномной амплификации ДНК из клеток трофэктодермы составила 98,1% (153 из 156). В 72,5% (в 111 из 153) бластоцист был обнаружен хромосомный дисбаланс, в то время как сбалансированный кариотип был установлен в 27,5% (в 42 из 153) бластоцист. Частота бластоцист с хромосомным дисбалансом в группе женщин до 35 лет составила 53% (20 из 38), в то время как в группе женщин старше 35 лет она была равна 81% (75 из 93). Таким образом, частота хромосомных нарушений в бластоцистах оказалась значимо выше в группе женщин старше 35 лет ($\chi^2 = 10{,}62$; $p < 0{,}002$), что соответствует литературным данным [2, 6, 7].

Среди выявленных хромосомных нарушений 77% (192 из 249) являлись анеуплоидиями, а 23% (57 из 249) – структурными аберрациями хромосом. Вероятно, большая доля структурных хромосомных аномалий объясняется тем, что в анализируемой выборке 26 бластоцист (17%) были получены от семейных пар со сбалансированными транслокациями. Частота трисомий и моносомий аутосом была одинаковой и составила 45,8% (88 из 192). Кроме того, были выявлены тетрасомии аутосом (2,1%, 4 из 192), нуллисомии аутосом (0,5%, 1 из 192) и анеуплоидии половых хромосом (5,7%, 11 из 192). Наиболее часто отмечались анеуплоидии хромосом 15, 16, 17, 21 и 22.

Была получена информация о результатах переносов 26 бластоцист со сбалансированным набором хромосом. Частота наступления беременности составила 35% (9 из 26). Однако впоследствии у двух женщин была диагностирована замершая беременность (8%). Возраст одной из них – 29 лет, и она является носительницей сбалансированной транслокации 46,XX,t(2;8)(q23;p21). Возраст второй женщины – 40 лет. По всей видимости, отрицательные результаты переносов и замершие беременности были обусловлены другими факторами, не связанными с хромосомной конституцией эмбрионов.

Заключение. Таким образом, анализ хромосомных аберраций методом aCGH показал, что частота бластоцист с хромосомными аномалиями повышается с увеличением возраста женщин. Преимплантационный генетический скрининг анеуплоидий методом aCGH позволяет отбирать для переноса в полость матки бластоцисты со сбалансированным набором хромосом, однако не дает возможности гарантировать успешный исход беременности.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Alfarawati S., Fragouli E., Colls P. et al.* The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality and embryo gender // Fertil. Steril. 2011. V. 95, № 2. P. 520–524.
2. *Yang Z., Liu J., Collins G.S. et al.* Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study // Mol. Cytogenet. 2012. V. 5 (1). P. 24.
3. *Hassold T., Hunt P.* Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we knew // Curr. Opin. Pediatr. 2009. V. 21, № 6. P. 703–708.
4. *Vanneste E., Voet T., Le Caignec C. et al.* Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos // Nat. Med. 2009. V. 15, № 5. P. 577–583.
5. *Wilton L.* Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization // Hum. Reprod. Update. 2005. V. 11, № 1. P. 33–41.
6. *Ata B., Kaplan B., Danzer H. et al.* Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated // Reprod. Biomed. Online. 2012. V. 24, № 6. P. 614–620.
7. *Harton G.L., Munné S., Surrey M. et al.* Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization // Fertil. Steril. 2013. V. 100, № 6. P. 1695–1703.

МИКРОРНК MIR-326: СОГЛАСОВАННОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ЭКСПРЕССИИ В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

А.А. Зарубин[1], А.В. Марков[1], Д.В. Шарыш[2], А.Н. Казанцев[3], Н.Н. Бурков[3], О.Л. Барбараш[3], В.П. Пузырёв[1, 2], М.С. Назаренко[1, 2, 3]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск
[3] Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово

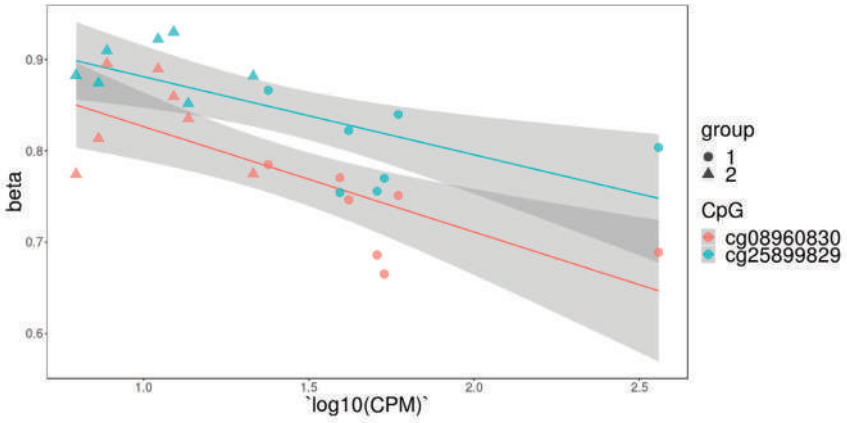
Введение. Метилирование ДНК и микроРНК регулируют экспрессию генов, характеризуются относительной стабильностью и тканеспецифичностью и связаны с процессами, происходящими в атеросклеротической бляшке. Однако до сих пор не установлено, как эти механизмы координируются.

Цель работы – оценить экспрессию микроРНК в одних и тех же образцах атеросклеротических бля-

шек сонных артерий в зависимости от рассчитанного клеточного состава атеросклеротических бляшек на основе анализа уровня метилирования ДНК.

Материал и методы. Атеросклеротические бляшки сонных артерий были получены от пациентов после каротидной эндатерэктомии (14 человек, 9 мужчин и 5 женщин; (64,9 ± 6,2) года). Для определения уровня метилирования ДНК был использован метилочип Infinium MethylationEPIC BeadChip, содержащий 850 000 CpG-сайтов. Экспрессия микроРНК определялась с использованием набора NEBNext Multiplex Small RNA Library и секвенирования на приборе HiSeq1500 (Illumina). Последующая обработка данных проводилась в программной среде R с использованием различных библиотек (limma, minfi, edgeR, mclust, Rtsne, psych), а также программного пакета miARma-Seq. В качестве параметра, описывающего уровень экспрессии микроРНК, был выбран показатель CPM (Counts Per Million – количество прочтений на миллион). Различия в среднем уровне и дисперсии количества микроРНК в группах сравнения, а также дифференциальное метилирование CpG-сайтов считались таковыми при преодолении порога статистической значимости с поправкой Бенджамини – Хохберга (*pFDR* < 0,05). Для оценки связи между количественными показателями использовался коэффициент корреляции Спирмена *ρ*.

Результаты. Выявлено, что по профилю метилирования проанализированных CpG-сайтов атеросклеротические бляшки делятся на две группы. Данное разделение наблюдалось как по уровню метилирования всех CpG-сайтов, так и CpG-сайтов только генов микроРНК (указанных в аннотации производителя метилочипа). Аналогично образцы разделялись на такие же группы в соответствии с уровнем экспрессии микроРНК в них. Для объяснения биологического смысла обнаруженной группировки мы рассчитали клеточный состав атеросклеротических бляшек с использованием библиотеки EpiDISH [1]. Расчетная доля лейкоцитов полностью объясняла разделение на эти группы. Между группами было идентифицировано 205 489 (24%) дифференциально метилированных CpG-сайтов. Из 295 микроРНК, которые показывали уровень экспрессии более 10 CPM в пяти и более образцах, 50 (17%) были дифференциально экспрессированы, при этом 14 (5%) из них демонстрировали значимые различия дисперсий в группах сравнения. При проведении пермутационного теста с тысячекратной повторностью выявлено, что вероятность получить подобный или лучший результат для дифференциальной экспрессии микроРНК составляет 0,1%, а для различия дисперсий уровня экспрессии микроРНК – 0,5%. В качестве примера мы рассмотрели связь уровня экспрессии miR-326 с уровнем метилирования восьми CpG-сайтов, находящихся вблизи данной микроРНК. Эта микроРНК была выбрана, поскольку она показала наиболее значимые различия в обоих тестах. Уровень метилирования двух CpG-сайтов показал статистически значимую корреляцию с уровнем экспрессии (cg08960830, ρ = –0,78, p = 0,002; cg25899829, ρ = –0,76, p = 0,002) (рисунок).



Корреляция уровня экспрессии miR-326 с уровнем метилирования CpG-сайтов: beta – уровень метилирования CpG-сайтов; group 1 – группа с высокой лейкоцитарной инфильтрацией; group 2 – группа с низкой лейкоцитарной инфильтрацией

Обсуждение и выводы. Одновременная оценка уровня метилирования CpG-сайтов ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках позволяет выделить молекулярные подтипы атеросклеротического поражения, которые соотносятся с предсказанным клеточным составом образцов. Между этими молекулярно-генетическими подтипами наблюдается статистически значимое различие по среднему значению и дисперсии уровня экспрессии 14 микроРНК. Уровень экспрессии miR-326, показавшей наиболее значимые различия по дифференциальной экспрессии и вариабельности между группами атеросклеротических бляшек с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией, отрицательно коррелировал с уровнем метилирования двух CpG-сайтов. Оба CpG-сайта, так же как и сама микроРНК, находятся в первом интроне гена *ARRB1*, cg08960830 локализован на расстоянии около 1 kb от точки начала транскрипции гена *MIR326*, что может свидетельствовать о потенциальном вхождении данного сайта в состав промоторной области, а cg25899829 располагается в области гена незрелой miR-326, что может свидетельствовать либо об однонаправленном изменении уровня метилирования данного сайта и cg08960830, либо о более глубоких механизмах регуляции. Согласно базе данных FANTOM5 [2], miR-326 имеет максимальный уровень экспрессии в клетках моноцитарного ростка, в частности в макрофагах, а гладкомышечные клетки «обеднены» данной микроРНК, что в значительной

степени согласуется с представлением о клеточной специфичности данной микроРНК.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Zheng S.C., Breeze C.E., Beck S., Teschendorff A.E.* Identification of differentially methylated cell-types in Epigenome-Wide Association Studies // Nat. Methods. 2018. V. 15, № 12. P. 1059–1066.
2. *De Rie D., Abugessaisa I., Alam T. et al.* An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35, № 9. P. 872–878.

СИНДРОМ ФЕЛАН – МАКДЕРМИД

А.С. Иванова, Л.В. Гусева

Областная клиническая больница, медико-генетическая консультация областного перинатального центра, г. Омск

Синдром Фелан – МакДермид – наследственный синдром, сопровождающийся аутизмом. Причиной заболевания является наличие микроделеции 22q13 или мутации в гене *SHANK3*, локализованном в этом же районе. Впервые был описан в 1985 г., в самостоятельную нозологическую форму он был выделен в 2001 г. (OMIM 606232). Синдром характеризуется диффузной мышечной гипотонией, отсутствием речи, аутизмом, судорогами, ускоренным ростом, умеренно выраженными черепно-лицевыми дисморфиями. Отсутствие специфических клинических проявлений синдрома приводит к тому, что он часто остается недиагностированным. Частота синдрома составляет 2,6–10 случаев на 1 млн новорожденных.

В нашей медико-генетической консультации в 2018 г. впервые был поставлен диагноз «синдром Фелан – МакДермид» ребенку в возрасте 6 лет.

Впервые семья обратилась в МГК, когда ребенку было 4 года. Жалобы на грубую задержку развития: девочка не разговаривает, не понимает обращенную речь, плохо ходит, постоянно делает хлопающие движения, самообслуживания нет, пищу ест протертую, судороги на фоне температуры. Принимают противосудорожные препараты. На инвалидности.

Из анамнеза: пробанд от четвертой доношенной беременности, третьих родов, кровное родство родителей отрицается, воздействие неблагоприятных факторов в первом триместре отрицается, в семье имеется два здоровых сибса, в период беременности мать перенесла ОРВИ в 20 недель, при УЗИ была выявлена вентрикуломегалия.

Роды срочные, масса тела – 3 170 г, рост – 52 см, оценка по шкале Апгар – 8/8 баллов, в период новорожденности была переведена в перинатальный центр с диагнозом «церебральная ишемия 2-й степени, синдром возбуждения, кривошея, неонатальная желтуха». Вскармливание грудное до 1 недели. Психомотрное развитие: держит голову с 1 месяца, сидит с 7 месяцев, ходит с 1,5–2 лет, не говорила. Физическое развитие выше среднего. Первый приступ эпилепсии – в 2 года на фоне повышенной температуры, в дальнейшем на фоне лечения сохраняются редкие генерализованные судорожные приступы фебрильные и афебрильные. Физическое развитие в 4 года высокое: масса тела – 22 кг, рост – 110 см. МРТ головного мозга: сочетанная гидроцефалия; УЗИ брюшной полости: гепатоспленомегалия, диффузные изменения в поджелудочной железе, деформация желчного пузыря, увеличение линейных размеров, пиелоэктазия слева. ЭхоКГ: структурных изменений сердца и нарушений гемодинамики не выявлено. Систематически наблюдается у невролога с диагнозом «врожденная гидроцефалия сообщающаяся, субкомпенсированная, грубая задержка психического развития, анартрия»; у эпилептолога: эпилепсия, генерализованные судорожные приступы фебрильные и афебрильные, без ремиссии; у офтальмолога: ангиопатия сетчатки обоих глаз; у логопеда: системное недоразвитие речи 1-го уровня, дизартрия.

Фенотип в 6 лет: масса тела – 28 кг, рост – 125, окружность головы – 56 см, костный возраст опережает паспортный. Физическое развитие выше среднего, череп макроцефальный. Лицевые микроаномалии: удлиненное лицо, высокий лоб, длинный фильтр, узкие глазные щели, макротия, низко расположенные большие ушные раковины. Крупные кисти, синдактилия II–III пальцев на ногах, диффузно снижен тонус мышц, ребенок ходит с поддержкой на широко расставленных ногах, сухожильные рефлексы рук и ног снижены, тоны сердца приглушены.

В 2018 г. консультирована генетиком в Медико-генетическом научном центре РАН.

Диагноз: эпилепсия. Тяжелая умственная отсталость. Синдром Ретта? Проведено обследование. ТМС: по результатам исследования данных за наследственные аминоацидопатии, органические ацидурии и дефекты митохондриального бета-окисления не выявлено. Концентрация органических кислот в пределах нормы. При секвенировании гена *MECP2* патогенных и вероятно патогенных вариантов не обнаружено.

При повторной консультации в МГК Омской областной больницы врачом-генетиком назначено цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование на наличие микроделеционных синдромов. При флуоресцентной гибридизации *in situ* с зондом 22q11(*TBX1*)/22q13(*SHANK3*) Kreatech (Нидерланды) выявлена делеция *SHANK3* в районе 22q13. Кариотип 46,XX.ish del(22)(q13)(*SHANK3*-). Фенотип и течение заболевания полностью соответствуют выявленной хромосомной аберрации.

В настоящее время девочка находится под наблюдением врача-генетика, планируется обследование родителей и сибсов молекулярно-цитогенетическим методом с зондом, содержащим ген *SHANK3*.

При планировании и ведении беременности в данной семье возможно проведение пренатальной диагностики в первом триместре беременности.

Синдром Фелан – МакДермид характеризуется генетической гетерогенностью вследствие различных размеров делеции участка хромосомы 22q13, для его диагностики необходимо использовать стандартный цитогенетический анализ, молекулярно-цитогенетический FISH-анализ с ДНК-зондом на последовательность гена *SHANK3*, хромосомный микроматричный анализ или секвенирование гена *SHANK3*.

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У РАБОТНИКОВ СИБИРСКОГО ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА

Д.С. Исубакова[1, 2], М.В. Халюзова[1], Е.В. Брониковская[1], О.С. Цымбал[1], Р.М. Тахауов[1, 3], А.Б. Карпов[1, 3], Л.Р. Тахауова[3], Н.В. Литвяков[1, 2]

[1] Северский биофизический научный центр ФМБА России, г. Северск
[2] Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[3] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

В ходе изучения показателей частоты и спектра цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината (СХК), в процессе профессиональной деятельности подвергавшихся хроническому радиационному облучению, были получены данные, которые позволили подтвердить или опровергнуть ранее выдвинутые гипотезы [1].

В исследуемую группу вошли 1 308 работников СХК, которые подвергались хроническому воздействию внешнего (γ-излучение), внутреннего (за счет инкорпорированного ^{239}Pu) или сочетанного (внешнего и внутреннего) облучения в процессе профессиональной деятельности. Контрольную группу составили 100 работников СХК, не подвергавшихся радиационному воздействию. Для всех обследованных лиц был проведен стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови. Анализировали парные фрагменты, аберрации хромосомного типа, кольца, дицентрики, хроматидные фрагменты, аномальные моноцентрики, хроматидные обмены, полиплоидные и мультиаберрантные клетки.

Была обнаружена слабая корреляция с возрастом для аберраций хромосомного типа, колец, дицентриков и полиплоидов (*r* колебался от 0,09 до 0,19). Частота цитогенетических нарушений не коррелировала с гендерной принадлежностью работников СХК. Для индукции цитогенетических нарушений определяющим фактором являлось хроническое внешнее облучение. При дополнительной радиационной нагрузке за счет инкорпорированного ^{239}Pu в крови работников с сочетанным облучением, по сравнению с работниками, подвергавшимися только внешнему облучению, частота цитогенетических нарушений была снижена. Было показано, что дозовая зависимость имеет нелинейный S-образный характер для аберрантных клеток (рис. 1), дицентриков (рис. 2), аберраций хромосомного типа (рис. 3), парных фрагментов, хроматидных обменов и хроматидных фрагментов. На рис. 1–3 указаны два уровня значимости статистических различий: p^* – уровень статистической значимости различий с контролем; $p_{1\text{-}7}$ – уровень статистической значимости различий с предыдущей точкой. Явление гормезиса показано для аберрантных клеток, аберраций хромосомного типа, установлено для парных фрагментов и не подтверждено для хроматидных фрагментов. Пороговый уровень для повышения частоты цитогенетических нарушений зависел от их типа и реализовался в диапазоне 10–200 мЗв. В диапазоне доз 100–800 мЗв отмечалось выраженное плато. После 500 мЗв для дицентрических хромосом и после 800 мЗв для других типов цитогенетических нарушений их частота возрастала прямо пропорционально дозе внешнего облучения. Для кольцевых хромосом, аномальных моноцентриков, мультиаберрантных клеток и полиплоидов дозовой зависимости не установлено.

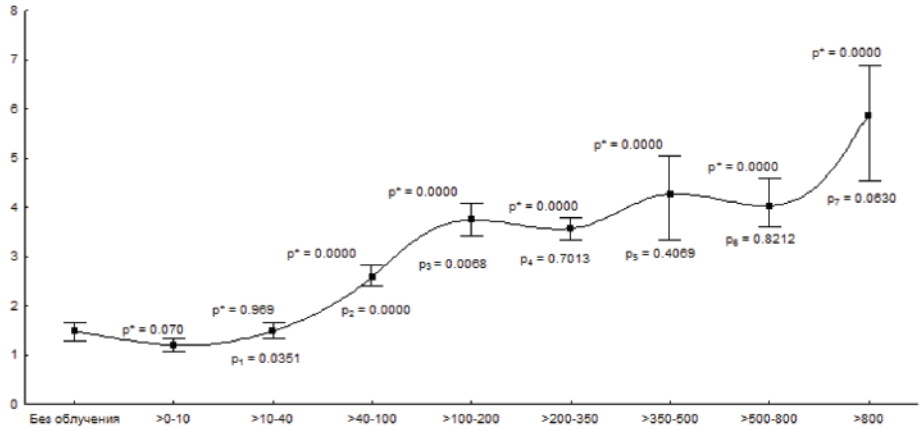


Рис. 1. Зависимость частоты аберрантных клеток у работников СХК от дозы внешнего облучения, мЗв

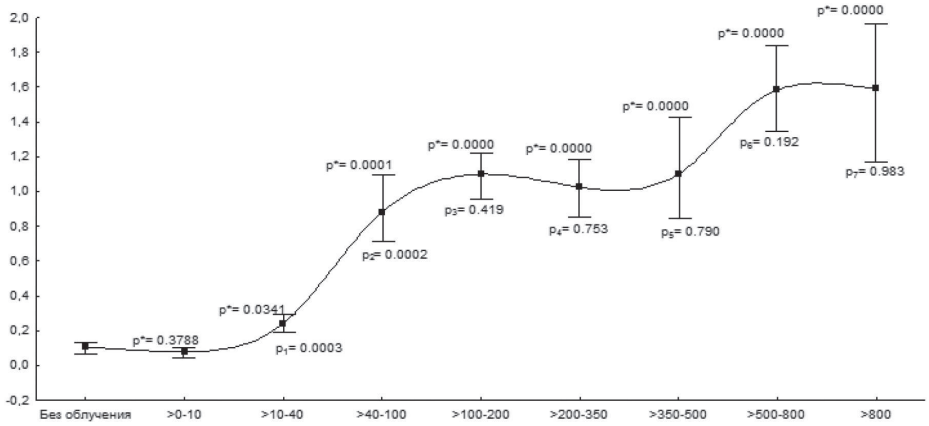


Рис. 2. Зависимость частоты дицентриков у работников СХК от дозы внешнего облучения, мЗв

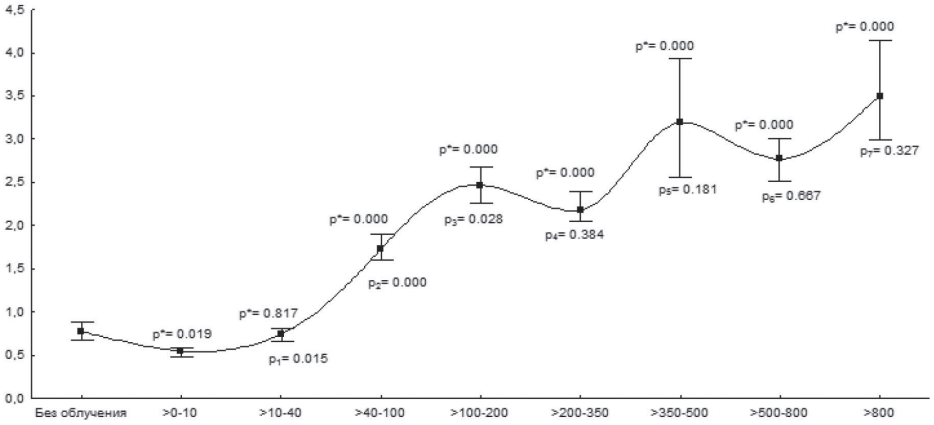


Рис. 3. Зависимость частоты аберраций хромосомного типа у работников СХК от дозы внешнего облучения, мЗв

Литература

Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В. и др. Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 3. С. 283–296.

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ CNV В ОНТОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Кашеварова, И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

При проведении полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) установлено, что многие локусы в геноме человека содержат варианты, ассоциированные с множественными патологическими фенотипами (перекрестные фенотипические ассоциации) [1]. Перекрестные фенотипические ассоциации указывают на то, что заболевания имеют общие генетические пути, и подчеркивают значимость плейотропии в патологии человека. Под плейотропией понимается множественный эффект одного локуса, в котором мутации и (или) генетические варианты могут приводить к развитию более одной патологии.

Очевидно, что плейотропным эффектом могут обладать не только однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), но и вариации числа копий участков ДНК (CNV), затрагивающие как один ген или его часть, так и несколько рядом расположенных генов. CNV – фрагменты ДНК размером более 1 000 п.н., отличающиеся по числу копий от референсного генома [2]. CNV могут являться фенотипически нейтральными вариантами, а могут вызывать заболевание, изменяя дозу гена(ов), повреждая ген(ы), образуя новый химерный ген, или за счет позиционного эффекта. Независимо от количества вовлеченных в CNV генов у пациентов зачастую выявляется множество разнообразных симптомов. Поиск патогенетически значимых CNV ведется при разных патологиях: интеллектуальных и поведенческих расстройствах, пороках сердечно-сосудистой системы, ожирении, нарушении эмбрионального развития и т.д. С накоплением данных все больше обращают на себя

внимание ситуации, когда одна и та же аберрация встречается при разных заболеваниях.

В поле нашего зрения оказалось такое патологическое состояние, как нарушение эмбрионального развития. С помощью микроматричного хромосомного анализа нами исследованы 52 образца плацентарных тканей спонтанных абортусов человека первого триместра беременности. Выявлены 120 вариаций числа копий участков ДНК (CNV), затрагивающих один или несколько генов (всего 427 генов). С использованием биоинформатического анализа обогащения при применении онтологии «Фенотип млекопитающих» все гены были отнесены к 183 категориям ($p \leq 0{,}05$). Категория «Эмбриогенез» включала 22 гена: *AIP*, *BMP4*, *BMP5*, *CDKN1C*, *EXT1*, *GAB1*, *H19*, *HOXD13*, *IGF2*, *KIT*, *LDHA*, *NKX2-5*, *NRK*, *PEG3*, *PHLDA2*, *SMCHD1*, *SMN1*, *TBX3*, *TGIF1*, *TH*, *TLX2*, *TRRAP*. При мутациях в каждом из этих генов описаны патологические состояния и в постнатальном периоде.

Например, ген *AIP* кодирует белок, взаимодействующий с арил-гидрокарбоновым рецептором. У мыши делеция данного гена в гомозиготном состоянии приводит к сниженному притоку крови к голове и конечностям, порокам сердца, перикардиальному отеку и эмбриональной гибели [3]. У человека же делеция данного гена ассоциирована с аденомой гипофиза [4, 5]. Мутации и делеции гена опухолевого супрессора *CDKN1C* у человека могут приводить как к рождению детей с синдром Видеманна – Беквита (OMIM 130650) или синдромом IMAGE (Intrauterine growth retardation, Metaphyseal dysplasia, Adrenal hypoplasia congenital, and Genital anomalies, OMIM 614732), так и к внутриутробной гибели плода [6]. В гене *Trapp*, кодирующем белок, участвующий в регуляции транскрипции и репарации ДНК, некоторые мутации в гомозиготном состоянии у мыши приводят к гибели на доимплантационной стадии вследствие блокировки пролиферации клеток бластоцисты [7]. У человека мутации в данном гене ассоциированы с некоторыми формами рака, включая глиобластому, а также с аутизмом и синдромальными интеллектуальными нарушениями [8].

При анализе полученных нами данных обращает на себя внимание тот факт, что каждый из указанных 22 генов, ассоциированных с эмбриогенезом, дополнительно связан с той или иной патологией в постнатальном периоде, при этом удивительно, что большая часть этих генов (59%) важна для нормального развития и функционирования центральной нервной системы (*AIP*, *BMP4*, *BMP5*, *GAB1*, *IGF2*, *LDHA*, *PEG3*, *PHLDA2*, *SMCHD1*, *SMN1*, *TGIF1*, *TH*, *TRRAP*). В связи с этим встает ряд вопросов. Почему один и тот же ген может приводить к нарушению эмбриогенеза и работы мозга? Вероятно, «гены мозга» – самая распространенная группа генов в геноме человека, и некоторым из этих генов эволюционно «пришлось» взять на себя функцию регуляции эмбриогенеза. Что обусловливает такие разные эффекты при нарушении функций одних и тех же генов? Тип мутации – точковая или структурная, в том числе связанная с изменением копийности (CNV)? Полярность CNV – микроделеция или микродупликация? Очевидно, что протяженные микроделеции и микродупликации могут иметь другие последствия, может быть, более выраженные, затрагивая несколько дозозависимых генов. Моногенные CNV должны иметь эффект, близкий к точковым мутациям. Однако не стоит забывать, что в интронах генов могут располагаться регуляторные элементы, а следовательно, патогенетические последствия могут отличаться от тех, что отмечены при точковых мутациях. Кроме того, дополнительно может иметь место позиционный эффект, когда наряду, например, с гаплонедостаточностью делетированного гена следующий за ним ген попадет под чужой промотор, и изменение его экспрессии будет давать дополнительный эффект. Известно, что микродупликации имеют, как правило, менее выраженные патологические последствия по сравнению с микроделециями в тех же областях. Однако в настоящем исследовании у спонтанных абортусов в большинстве случаев зарегистрированы именно микродупликации. Несомненно, что некоторый вклад в наблюдаемый феномен онтогенетической плейотропии CNV могут вносить другие генетические и средовые факторы, которые зачастую выявить и учесть очень сложно.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 14-04-32047) и темы государственного задания НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН.

Литература

1. *Sivakumaran S., Agakov F., Theodoratou E. et al.* Abundant pleiotropy in human complex diseases and traits // Am. J. Hum. Genet. 2011. V. 89, № 5. P. 607–618.
2. *Capalbo A., Rienzi L., Ubaldi F.M.* Diagnosis and clinical management of duplications and deletions // Fertil. Steril. 2017. V. 107, № 1. P. 12–18.
3. *Lin B.C., Sullivan R., Lee Y. et al.* Deletion of the aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9 leads to cardiac malformation and embryonic lethality // J. Biol. Chem. 2007. V. 282, № 49. P. 35924–35932.
4. *Chen B., Liu P., Hujber E.J. et al.* AIP limits neurotransmitter release by inhibiting calcium bursts from the ryanodine receptor // Nat. Commun. 2017. V. 8 (1). P. 1380.
5. *Georgitsi M., Heliövaara E., Paschke R. et al.* Large genomic deletions in *AIP* in pituitary adenoma predisposition // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008. V. 93, № 10. P. 4146–4151.
6. *De Crescenzo A., Sparago A., Cerrato F. et al.* Paternal deletion of the 11p15.5 centromeric-imprinting control region is associated with alteration of imprinted gene expression and recurrent severe intrauterine growth restriction // J. Med. Genet. 2013. V. 50, № 2. P. 99–103.
7. *Herceg Z., Hulla W., Gell D. et al.* Disruption of *Trrap* causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression // Nat. Genet. 2001. V. 29, № 2. P. 206–211.
8. *Cogné B, Ehresmann S., Beauregard-Lacroix E. et al.* Missense variants in the histone acetyltransferase complex component gene *TRRAP* cause autism and syndromic intellectual disability // Am. J. Hum. Genet. 2019. V. 104, № 3. P. 530–541.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ *MIR21* И *CARMN* (*MIR143HG*) ПРИ ОСЛОЖНЕННОМ ТЕЧЕНИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Ю.А. Королёва[1], Р.Р. Салахов[1, 2], А.В. Марков[1], Д.В. Шарыш[2], А.А. Слепцов[1], А.Н. Казанцев[3], О.Л. Барбараш[3], Н.Н. Бурков[3], В.П. Пузырёв[1, 2], М.С. Назаренко[1, 2, 3]

[1] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск*
[2] *Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*
[3] *Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово*

Актуальность. Осложнения атеросклероза, такие как ишемический инсульт и инфаркт миокарда, остаются одной из основных причин смертности в мире. Важной компонентой развития таких нарушений является нестабильность атеросклеротической бляшки. Показано, что во многие биологические процессы, ведущие к дестабилизации бляшки, вовлечены такие малые регуляторные молекулы, как микроРНК. В частности, с нестабильностью атеросклеротического поражения сонных артерий связано изменение экспрессии miR-21 и miR-143/145 [1]. В свою очередь экспрессия данных микроРНК подвергается эпигенетической регуляции, в том числе с помощью метилирования ДНК в промоторных регионах соответствующих генов – *MIR21* и *CARMN* (он же *MIR143HG*) [2, 3]. Тем не менее исследования вариабельности метилирования промоторных регионов данных генов как при атеросклерозе, так и при его осложнениях отсутствуют.

Цель работы – оценить связь уровня метилирования промоторных регионов генов *MIR21* и *CARMN* в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и лейкоцитах крови больных атеросклерозом с нестабильностью бляшки и осложнениями атеросклероза.

Материал и методы. Выборка больных с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий составила 100 человек в возрасте от 44 до 82 лет (в среднем 65 лет), из них 65 мужчин и 35 женщин. У всех пациентов при ультразвуковом исследовании был обнаружен стеноз более 70% просвета сонной артерии, что является показанием к каротидной эндартерэктомии. Инфаркт миокарда в анамнезе был зарегистрирован у 28 пациентов, острое нарушение мозгового кровообращения (транзиторная ишемическая атака или инсульт) в анамнезе отмечено у 36 пациентов, сахарный диабет второго типа выявлен у 30 больных.

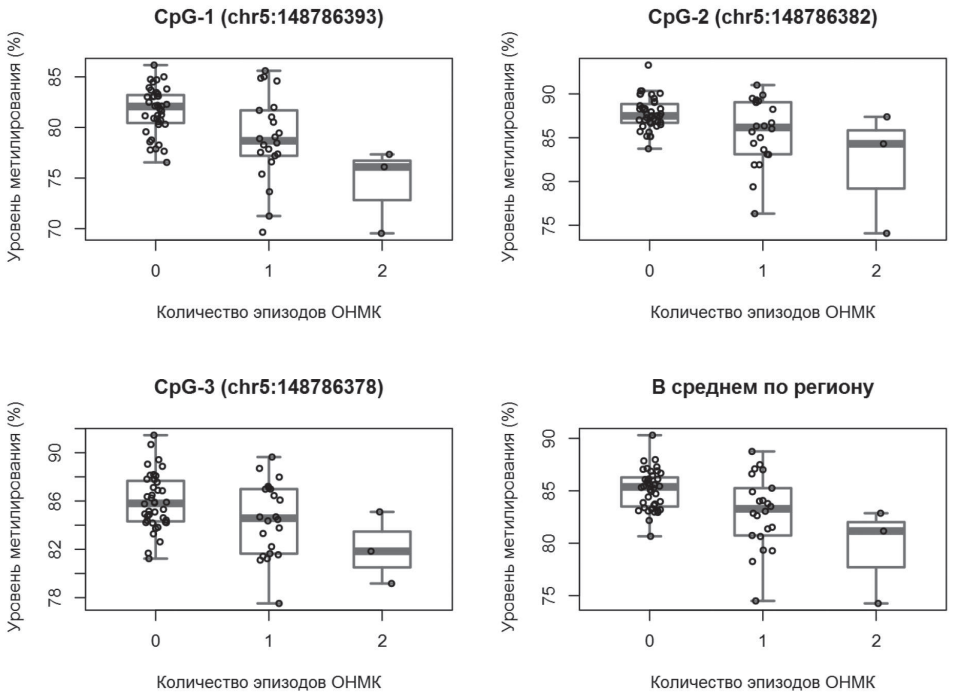
Образцы атеросклеротических бляшек сонных артерий (БСА) получены в результате каротидной эндартерэктомии. При гистологическом исследовании для каждой бляшки был определен ее тип по классификации H. Stary и соавт. [4], при этом бляшки III и IV типов были отнесены к стабильным (n = 23), а V и VI типов – к нестабильным (n = 77). Образцы лейкоцитов периферической крови (ЛПК) получены от тех же пациентов до оперативного вмешательства. После выделения из образцов ДНК и ее бисульфитной модификации проводилась полимеразная цепная реакция. Последовательность праймеров на промоторный регион гена *MIR21* (3 CpG-сайта) взята из публикации A. Adams и соавт. [5]. Праймеры на промоторный регион гена *CARMN* (3 CpG-сайта) подобраны с помощью онлайн-инструментов (MethPrimer 2.0; BiSearch; Thermo Fisher Scientific Primer Designer Tool).

Уровень метилирования ДНК проанализирован методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, Германия). Для каждого образца получены количественные данные об уровне метилирования изучаемого CpG-сайта в процентах. Статистический анализ данных проводили в программе PSPP-0.10.4 (Free Software Foundation). Для сравнения уровней метилирования CpG-сайтов в различных подгруппах использовался критерий Манна – Уитни; для анализа корреляций – коэффициент *Rho* Спирмена. Отдельно рассматривалась как гистологическая нестабильность атеросклеротической бляшки, так и клиническая нестабильность, то есть наличие инфаркта или острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) в анамнезе пациента.

Результаты и обсуждение. При сравнении БСА и ЛПК между собой без разделения на подгруппы уровень метилирования обоих изученных регионов в БСА оказался значимо ниже, чем в ЛПК, составив по региону *MIR21* в целом 12,33 (8,75–14,64)% и 25,78 (20,98–32,24)% соответственно (p < 0,001; указана медиана (Q1–Q3), а для *CARMN* – 35,60 (21,95–44,22)% и 84,03 (82,86–86,11)% соответственно (p < 0,001).

При разделении БСА по гистологической нестабильности, а также по наличию инфаркта миокарда или ишемического инсульта в анамнезе наблюдаемые различия уровня метилирования ДНК не достигли статистической значимости ни для БСА, ни для парных им лейкоцитов. Тем не менее для ЛПК обнаружена значимая обратная корреляция уровня метилирования всех CpG-сайтов гена *CARMN* с числом перенесенных инсультов (для гена в целом: *Rho* = –0,367; p = 0,002). При разделении ЛПК по стабильности бляшки у пациентов данная корреляция сохранялась в подгруппе нестабильных бляшек (*Rho* = –0,419; p = 0,002), но становилась незначимой в подгруппе стабильных (*Rho*= –0,189; p = 0,5). Уровень метилирования в ЛПК для гена *CARMN* в среднем при отсутствии инсультов составил 85,32 (83,23–86,11)%, при одном инсульте – 83,51 (80,74–84,91)% и при двух инсультах – 81,16 (77,71–82,01)% (рисунок).

Выводы. У пациентов с клинически выраженным атеросклерозом уровень метилирования промоторных регионов *MIR21* и *CARMN (MIR143HG)* тканеспецифичен: в пораженных артериях он ниже, чем в лейкоцитах периферической крови. Уровень метилирования *CARMN* в лейкоцитах периферической крови больных с нестабильным атеросклерозом обратно коррелирует с числом перенесенных инсультов.



Уровень метилирования CpG-сайтов гена *CARMN* в лейкоцитах больных атеросклерозом в зависимости от числа перенесенных инсультов: ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Markus B., Grote K., Worsch M. et al.* Differential expression of microRNAs in endarterectomy specimens taken from patients with asymptomatic and symptomatic carotid plaques // PloS one. 2016. V. 11 (9): e0161632.
2. *Zhang H., Wang Y.H., Cao C.J. et al.* A regulatory circuit involving miR-143 and DNMT3a mediates vascular smooth muscle cell proliferation induced by homocysteine // Mol. Med. Rep. 2016. V. 13, № 1. P. 483–490.
3. *Ortiz I., Barros-Filho M.C., Dos Reis M.B. et al.* Loss of DNA methylation is related to increased expression of miR-21 and miR-146b in papillary thyroid carcinoma // Clin. Epigenetics. 2018. V. 10 (1). P. 144.
4. *Stary H., Chandler A.B., Glagov S. et al.* A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // Circulation. 1994. V. 89 (5). P. 2462–2478.
5. *Adams A., Kennedy N.A., Hansen R. et al.* Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's Disease implicates epigenetic alterations at the *VMP1*/*MIR21* and HLA loci // Inflamm. Bowel Dis. 2014. V. 20 (10). P. 1784–1793.

ИЗУЧЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В Т-ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Я.В. Кривощапова

Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, г. Челябинск

Поиск биомаркеров старения является важным направлением исследований для ученых во всем мире. В связи с этим активно изучаются клеточные структуры, в том числе теломерные районы. Теломерные последовательности – это нуклеотидно-протеиновые комплексы, расположенные на концевых участках хромосом. Они укорачиваются при каждом делении клетки, в результате существует лимит на количество делений, и как только длина концевого участка достигнет критической, произойдет включение программы клеточной гибели – апоптоза. Длина теломер может являться показателем биологического возраста человека и служить биомаркером старения. В разных клетках одного организма концевые последовательности могут отличаться по длине. Также представляет интерес выяснить, зависит ли длина теломерного участка от длины хромосомного плеча, на котором он расположен.

В нашем исследовании теломерные районы оценивались на препаратах метафазных хромосом, полученных из ФГА-стимулированных Т-лимфоцитов периферической крови. Теломерные участки были окрашены методом FISH с молекулярными зондами производства DAKO, для окраски хроматина применяли краситель DAPI, в качестве реперного сигнала служил центромерный район хромосомы 2. Изображения были оцифрованы с использованием микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с помощью ПО Isis. Программа оценки длины теломерного участка вычисляет длины теломер как отношение

между интенсивностью флуоресцентного сигнала теломер (Т) и сигнала от центромеры хромосомы 2, используемой в качестве внутреннего эталона в каждой анализируемой метафазе (С). Данные выражались в процентах от отношения Т/С [1, 2].

Для исследования индивидуальных особенностей был выбран донор, в анамнезе которого отсутствовали аутоиммунные и онкологические заболевания, а также на момент забора крови не было обострений хронических заболеваний. У донора было проанализировано 20 метафазных клеток хорошего качества. Для оценки зависимости длины теломерного участка от длины ДНК хромосомы были выбраны две пары метацентрических хромосом: самая крупная – хромосома 1 и представитель самых коротких метацентрических хромосом – хромосома 20. Для исследования зависимости длины теломер от длины плеч хромосом выбрали три пары акроцентрических хромосом – 13, 14 и 15.

Анализ 20 метафаз показал, что длина теломер в одной клетке очень неоднородна и располагалась в ряду от 2,25 до 82,84%.

Величины теломерных участков в паре гомологичных хромосом 1 варьировали от 5,71 до 82,84%. Средняя длина теломер хромосомы 1 по результатам подсчета в 20 клетках составила 27,19%, а 80% теломерных районов имели длину в пределах от 9 до 60%.

В хромосоме 20 длина теломерных участков варьировала от 5,43 до 65,98%. Средняя длина теломер хромосомы 20 была равна 19%, а 80% теломерных участков имели длину от 9 до 29%.

Таким образом, в ходе работы не было выявлено статистически значимых различий между длиной теломерных участков метацентрических хромосом 1 и 20, что свидетельствует о том, что длина теломерных районов – величина, не зависящая от размера хромосомы.

При исследовании длины теломерных районов в акроцентрических парах хромосом 13, 14 и 15 было обнаружено следующее. Величины теломерных участков варьировали от 2,25 до 65,91%. При этом оказалось, что в большинстве проанализированных клеток (80% и более) хромосомы 13, 14 и 15 имели в коротких плечах более длинные теломерные участки.

Для исследования зависимости длины теломер от возраста была сформирована группа доноров, в которую вошли три женщины, проживающие в г. Челябинске; возраст обследуемых – 20, 40 и 60 лет.

У каждой женщины анализировали 20 метафаз хорошего качества, без наложений хромосом. В ходе исследования определяли длину теломер всех 46 хромосом, распределенных по трем подгруппам: метацентрики, субметацентрики и акроцентрики. Также сравнивали длину теломерных районов одной и той же хромосомы на разных плечах.

Результаты исследования показали, что максимальные значения длины теломерных районов для некоторых хромосом были отмечены в клетках старшей женщины (возраст 60 лет). При анализе группы акроцентриков было показано, что, несмотря на малый размер коротких плеч у этой группы хромосом, длина теломерных районов не отличалась от других хромосом.

Для оценки пролиферативной активности клеток по признаку длины теломер определили процентное соотношение клеток с короткими и длинными теломерными участками. В результате у самого молодого донора были обнаружены максимальные количества клеток как с короткими, так и с длинными теломерными участками. Зависимость от возраста была отмечена только для теломерного участка длинного плеча (q) хромосомы 5 ($p < 0,05$).

На основании результатов исследования невозможно сделать однозначный вывод о том, что длина теломерных районов в хромосомах ФГА-стимулированных лимфоцитов может служить биомаркером биологического возраста человека. Это может объясняться тем, что Т-лимфоциты – гетерогенная популяция клеток, которую составляют короткоживущие и долгоживущие популяции клеток [3]. Поэтому длина теломерных участков будет различаться в разных клеточных линиях, а также, как показали наши исследования, она может варьировать даже в пределах одной клетки у разных хромосом [4].

Таким образом, на основании результатов, полученных в ходе исследования теломерных районов хромосом в Т-клетках человека при использовании метода FISH, можно сделать следующие выводы:

– длина теломерных районов хромосом в Т-лимфоцитах периферической крови человека различна. В одной клетке встречаются хромосомы как с короткими, так и с длинными теломерами, а также с потерей теломер;

– размер теломерного района не зависит от размера хромосомы;

– размер теломерного участка не зависит от размера хромосомного плеча;

– проблематично использовать показатель длины теломерных районов в Т-лимфоцитах периферической крови в качестве маркера биологического возраста человека в силу большой гетерогенности клеточных линий.

Литература

1. *Poon S.S., Martens U., Ward R., Landsorp P.* Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy // Cytometry. 1999. V. 36. P. 267–278.
2. *Perner S., Bruderlein S., Hasel C. et al.* Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence *in situ* hybridization and digital imaging // Am. J. Pathol. 2003. V. 163, № 5. P. 1751–1756.
3. *Tolstykh E.I., Degteva M.O., Vozilova A.V., Anspaugh L.R.* Local bone-marrow exposure: how to interpret the data on stable chromosome aberrations in circulating lymphocytes? (some comments on the use of FISH method for dose reconstruction for Techa riverside Residents) // Radiat. Environ. Biophys. 2017. V. 56 (4). P. 389–403.
4. *Возилова А.В., Кривощапова Я.В.* Изучение зависимости длины теломер от возраста человека // Достижения радиобиологии – медицине: материалы международной научно-практической конференции. 2018. С. 72–74.

ЭКЗОГЕННЫЕ МОДИФИКАТОРЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНОМА

А.Н. Кучер

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Любые живые организмы представляют собой открытые биологические системы, соответственно, на их функционирование оказывает влияние широкий спектр биотических и абиотических факторов среды. Прежде всего организмы нуждаются в эссенциальных веществах, необходимых для обеспечения роста и развития организма (в том числе и на уровне функционирования генома). Однако наибольший интерес вызывает поиск факторов, которые негативно сказываются на деятельности организма, приводя к структурным (хромосомные и геномные перестройки) или неблагоприятным функциональным изменениям (например, посредством эпигенетических модификаций) генома. Благодаря современным молекулярным технологиям, с одной стороны, значительно расширились представления о распространенности структурных перестроек хромосом в организме человека, появилось новое понимание механизмов, посредством которых реализуются неблагоприятные эффекты факторов среды (в том числе и мутагенных) и т.д., но, с другой стороны, возникли новые задачи, требующие решения. К числу таковых относятся оценка распространенности соматических мутаций и установление их значения в определении уровня здоровья.

Профили соматических мутаций в нормальных клетках человека характеризуются не только межиндивидуальной, но и межтканевой вариабельностью, что определяется мутационными нагрузками, пролиферативной активностью клеток, их способностью к репарации ДНК, а также зависит как от экзогенных, так и от эндогенных повреждающих ДНК агентов, с которыми клетки могут столкнуться [1]. Хорошо известно, что табачный дым обладает мутагенным действием и может способствовать возникновению хромосомных нарушений, но помимо прямого мутагенного действия курение может способствовать усилению мутагенеза посредством вовлеченности компонент табачного дыма в эпигенетическую регуляцию генов, продукты которых ответственны за репарационные процессы. Так, было установлено, что курение оказывает влияние на уровень метилирования CpG-сайтов ряда генов, в том числе и *MIR638* (повышает уровень метилирования) [2]. Под контролем данной микроРНК находится уровень экспрессии большого числа генов, среди которых избыточно представлены и гены, продукты которых значимы, с одной стороны, для формирования хромосомных аберраций (32 гена, достигнутый уровень статистической значимости с поправкой по методу Бенджамини – Хохберга $p = 8{,}33 \cdot 10^{-6}$), транслокаций (41 ген, $p = 4{,}35 \cdot 10^{-5}$), делеций (36 генов, $p = 2{,}18 \cdot 10^{-5}$), потери гетерозиготности (24 гена, $p = 0{,}0352$), вовлечены в регуляцию клеточного цикла (13 генов, $p = 0{,}0111$), ДНК-репликацию (36 генов, $p = 0{,}0142$), мисс-матч репарацию (4 гена, $p = 0{,}0429$) и т.д., с другой – для развития широкого спектра патологий, в том числе и тех, причиной которых могут выступать соматические мутации (рак легкого, аденома, нейробластома, лейкоз и др.). Влияние уровня экспрессии данной микроРНК на риск развития, особенности течения и ответ на лечение установлены для различных онкологических патологий во многих исследованиях.

На уровень экспрессии *MIR638* оказывают влияние и другие экзогенные средовые факторы, иногда в тканеспецифичной манере, как это было показано для неорганических соединений мышьяка (As) [3, 4]. В связи с этим интересно заметить, что, хотя мышьяк и не относится к категории мутагенов, его соединения могут вызывать цитогенетические нарушения (хромосомные аберрации, сестринские хроматидные обмены, микроядра), которые регистрируются как в лимфоцитах и фибробластах человека, так и в опухолевых линиях [5]. Установлено также, что TiO_2 (пищевая добавка Е171) обладает генотоксическим потенциалом и может приводить к повреждению хромосом [6]. При этом высокий уровень экспрессии генов ряда трансмембранных переносчиков (включая ионные каналы) может выступать в качестве фактора, повышающего вероятность повреждения ДНК, в том числе и вследствие увеличения поступления в клетку токсичных металлов [7].

Новый эффект на геном был установлен для ультрафиолетового света: под его воздействием могут происходить замена C→T в CpG-сайтах/островках, что в свою очередь может влиять на статус метилирования и уровень экспрессии генов [8].

На протяжении жизни индивиды постоянно сталкиваются со средовыми факторами, которые могут неблагоприятно сказываться на структуре и функции их генома. С возрастом может происходить накопление соматических мутаций. Например, при обследовании лиц в возрасте от 21 до 78 лет наблюдали увеличение частоты мутаций в резидентных стволовых клетках скелетных мышц (частота возникновения – три соматические мутации на геном в год) [9]. При этом наиболее часто мутации регистрировались в интронах и межгенных регионах, а экспрессирующиеся в мышцах гены оказались более защищены от мутаций. Но со временем все же происходит накопление мутаций в клетках скелетных мышц, и это, по мнению авторов, является причиной возрастных нарушений в мышцах.

Соматические мутации, в том числе и CNV, описаны в различных тканях и органах (крови, коже, луковицах волос, нервной системе, головном мозге, скелетных мышцах и др.) (см. [8, 10]). Следует отметить, что частота возникновения соматических мутаций зависит от баланса как неблагоприятных факторов, так и факторов, обладающих защитным эффектом (см. например [11]). Хотя наиболее активно изучается соматический мутагенез в опухолевых тканях, все более очевидным становится, что такие мутации происходят в разных тканях, и, соответственно, они могут выступать в качестве причины развития патологических процессов при более широком спектре заболеваний человека.

Литература

1. *Saini N., Gordenin D.A.* Somatic mutation load and spectra: A record of DNA damage and repair in healthy human cells // Environ. Mol. Mutagen. 2018. V. 59, № 8. P. 672–686.
2. *Кучер А.Н., Назаренко М.С., Марков А.В. и др.* Вариабельность профилей метилирования CpG-сайтов генов микроРНК в лейкоцитах и тканях сосудов при атеросклерозе у человека // Биохимия. 2017. Т. 82, № 6. С. 923–933.
3. *Sturchio E., Colombo T., Boccia P. et al.* Arsenic exposure triggers a shift in microRNA expression // Sci. Total Environ. 2014. V. 472, № 528. P. 672–680.
4. *Li X., Shi Y., Wei Y. et al.* Altered expression profiles of microRNAs upon arsenic exposure of human umbilical vein endothelial cells // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012. V. 34, № 2. P. 381–387.
5. *Roy J.S., Chatterjee D., Das N., Giri A.K.* Substantial evidences indicate that inorganic arsenic is a genotoxic carcinogen: a review // Toxicol. Res. 2018. V. 34, № 4. P. 311–324.
6. *Proquin H., Rodríguez-Ibarra C., Moonen C.G. et al.* Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions // Mutagenesis. 2017. V. 32, № 1. P. 139–149.
7. *Xia J., Chiu L.Y., Nehring R.B. et al.* Bacteria-to-human protein networks reveal origins of endogenous DNA damage // Cell. 2019. V. 176, № 1–2. P. 127–143.
8. *Saini N., Roberts S.A., Klimczak L.J. et al.* The impact of environmental and endogenous damage on somatic mutation load in human skin fibroblasts // PLoS Genet. 2016. V. 12 (10). P. e1006385.
9. *Franco I., Johansson A., Olsson K. et al.* Somatic mutagenesis in satellite cells associates with human skeletal muscle aging // Nat. Commun. 2018. V. 9 (1) P. 800.
10. *Campbell I.M., Shaw C.A., Stankiewicz P., Lupski J.R.* Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics // Trends Genet. 2015. V. 31, № 7. P. 382–392.
11. *López-Romero D., Izquierdo-Vega J.A., Morales-González J.A. et al.* Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: plants, vegetables, and natural resin // Nutrients. 2018. V. 10 (12): E1954.

ОНТОГЕНЕТИКА И ПАТОГЕНЕТИКА ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск.

Хромосомные болезни, обусловленные числовыми и структурными аномалиями хромосом, занимают существенное место в структуре врожденной и наследственной патологии человека, проявляясь нарушениями физического и интеллектуального развития организма, патологией репродуктивной сферы, в том числе бесплодием, онкологическими заболеваниями. Существенный компонент представлен и летальными хромосомными мутациями, обусловливающими раннюю остановку развития и гибель эмбрионов на пре- и постимплантационных этапах онтогенеза. Столь широкий диапазон фенотипических эффектов хромосомного дисбаланса обусловлен, очевидно, масштабностью хромосомных перестроек, затрагивающих одновременно значительное число генов – от нескольких десятков и сотен при микроструктурных аберрациях до нескольких тысяч при числовых нарушениях хромосом. Вместе с тем такое объяснение не раскрывает всей сложности патогенеза хромосомных болезней и комплексности межгенных взаимодействий, нарушаемых вследствие хромосомного дисбаланса. Появление в последние годы высокоразрешающих молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических технологий анализа кариотипа, таких как микроматричная сравнительная геномная гибридизация и массовое параллельное секвенирование, и их внедрение в исследовательскую и диагностическую практику позволили описать новый класс несбалансированных хромосомных перестроек (микроделеции или микродупликации), затрагивающих один ген или даже его отдельные фрагменты. В литературе появляются термины «моногенные CNV», «внутригенные CNV», стирающие границу между хромосомными и моногенными заболеваниями [1]. Однако такое исчезновение границ является, по-видимому, лишь терминологическим артефактом, поскольку подобные моногенные CNV, точно так же как и протяженные хромосомные мутации, неожиданно проявляются сложными комплексными нарушениями фенотипа, затрагивающими как изменения со стороны нервной системы (умственная отсталость или задержка интеллектуального развития), так и нарушения физического и моторного развития, лицевые дисморфии, множественные врожденные пороки развития. Причина такого парадокса во многом остается неясной и может быть объяснена либо спецификой плейотропных эффектов генов, попадающих в состав таких «моногенных CNV», либо нарушениями хромосомного уровня организации наследственной информации, затрагивающими в том числе топографию хромосомных территорий в пространстве клеточного ядра, внутри- и межхромосомные взаимодействия [2].

С использованием технологий клеточного репрограммирования и направленной клеточной дифференцировки нами впервые было показано, что увеличение числа копий гена *CNTN6* у пациента с «моногенной» хромосомной микродупликацией 3p26.3, затрагивающей единственный ген *CNTN6* [3], приводит к существенному снижению его экспрессии с дуплицированного аллеля в нейрональных клетках [4]. Таким образом, несмотря на увеличение копийности хромосомного (или генного) материала, уровень транскрипции гена и, соответственно, продукции кодируемого им белка оказывается сниженным, как и в случае с делецией. Выявленный факт гаплонедостаточности впервые дает возможность объяснить на молекулярном уровне феномен общности некоторых фенотипических признаков, наблюдаемых у пациентов с полярными изменениями в числе копий одних и тех же хромосомных регионов (реципрокными микроделециями, микродупликациями), лежащими в основе возникновения так называемых сестринских хромосомных болезней [5]. Кроме того, полученные нами данные подтверждают

ранее выдвинутую отечественным цитогенетиком К.Н. Гринбергом гипотезу «клеточного синдрома», согласно которой хромосомные мутации обладают выраженным гипоморфным эффектом, замедляя темпы развития организма за счет нарушения ключевых процессов клеточной пролиферации и дифференцировки [6].

Вместе с тем сделанное на нейрональных клетках наблюдение не позволяет объяснить другие отклонения физического развития у носителей таких моногенных CNV, как делеций, так и микродупликаций, – аномалии в форме черепа, лицевые дисморфии, пороки развития конечностей, аномалии внутренних органов [3, 7]. Является ли это следствием некоторых еще неизвестных плейотропных эффектов гена *CNTN6*, экспрессирующегося в некоторых отделах коры головного мозга, генетический полиморфизм которого, согласно последним литературным данным, неожиданно оказался ассоциированным и с формой черепа у кошек [8], и с уровнем липопротеинов низкой плотности [9], и с носительством определенной микрофлоры в кишечнике [10]? Либо это эффекты не самого гена, а хромосомной перестройки как таковой, нарушающей структурно-функциональную организацию хромосомы, ее топологию в пределах клеточного ядра, внутри-, межхромосомные взаимодействия?

Некоторые ответы на данные вопросы дают результаты транскриптомного профилирования нейронов с реципрокными хромосомными перестройками. При микроматричном анализе генной экспрессии нами были выделены четыре категории эффектов хромосомных микроделеций и микродупликаций, затрагивающих единственный ген *CNTN6*:

– снижение экспрессии ряда генов и при делеции, и при дупликации (402 дифференциально экспрессирующихся гена);

– повышение экспрессии ряда генов при делеции и при дупликации (25 генов);

– снижение экспрессии ряда генов при делеции, но повышение их же экспрессии при дупликации (эффект «прямой» дозовой зависимости от перестройки) (49 генов);

– повышение экспрессии ряда генов при делеции, но снижение их же экспрессии при дупликации («обратная» дозовая зависимость от перестройки) (51 ген).

Таким образом, полнотранскриптомный анализ генной экспрессии в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с микроделецией и микродупликацией гена *CNTN6*, показал, что нарушение копийности единственного гена может оказывать влияние на изменение экспрессии целого ряда других генов, непосредственно не вовлеченных в перестройку. Несмотря на значительные различия в количестве дифференциально экспрессирующихся генов в группах «дупликация *CNTN6* – норма» и «делеция *CNTN6* – норма», а также принимая во внимание вклад отличий по генотипам между исследуемыми клеточными линиями, отмечается общая тенденция к снижению экспрессии генов, продукты которых вовлечены в ключевые для развития мозга биологические процессы: регуляция синаптической передачи, рост и функционирование нервной системы и нейронов, нейрогенез, регуляция клеточного морфогенеза. Дальнейшее изучение полученных при анализе транскриптома данных позволит прояснить механизмы патогенеза микроделеции и микродупликации *CTNT6*, в частности, выявить нарушения функционирования конкретных молекулярных путей, а также идентифицировать новые, неизвестные на сегодняшний день молекулярные «партнеры» контактина-6. Кроме того, актуальным представляется изучение эффектов хромосомных аномалий в производных разных зародышевых листков.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-15-00772.

Литература

1. *Truty T.R., Kennemer M., Lincoln S.E. et al.* Prevalence and properties of intragenic copy-number variation in Mendelian disease genes // Genet. Med. 2018. V. 21, № 1. P. 114–123.
2. *Maass P.G., Barutcu A.R., Rinn J.L.* Interchromosomal interactions: A genomic love stories of kissing chromosomes // J. Cell Biol. 2019. V. 218, № 1. P. 27–38.
3. *Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al.* Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability // Mol. Cytogenet. 2014. V. 7 (1). P. 97.
4. *Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S. et al.* Allele-specific biased expression of the *CNTN6* gene in iPS cell-derived neurons from a patient with intellectual disability and 3p26.3 microduplication involving the *CNTN6* gene // Mol. Neurobiol. 2018. V. 55, № 8. P. 6533–6546.
5. *Golzio C., Katsanis N.* Genetic architecture of reciprocal CNVs // Curr. Opin Genet. Dev. 2013. V. 23, № 3. P. 240–248.
6. *Гринберг К.Н., Кухаренко В.И.* Реализация фенотипического эффекта хромосомных аномалий у человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 1. С. 32–39.
7. *Hu J., Liao J., Sathanoori M., Kochmar S. et al. CNTN6* copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders // J. Neurodev Disord. 2015. V. 7 (1). P. 26.
8. *Bertolini F., Gandolfi B., Kim E.S. et al.* Evidence for selection signatures that shape the Persian cat breed // Mamm. Genome. 2016. V. 27, № 3–4. P. 144–155.
9. *Wakil S.M., Ram R., Muiya N.P. et al.* A common variant association study reveals novel susceptibility loci for low HDL-cholesterol levels in ethnic Arabs // Clin. Genet. 2016. V. 90, № 6. P. 518–525.
10. *Turpin W., Espin-Garcia O., Xu W. et al.* Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort // Nat. Genet. 2016. V. 48, № 11. P. 1413–1417.

ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ: ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ И ЗНАЧИМОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Н.А. Лемская[1], С.А. Романенко[1], М.В. Резакова[2], А.А. Дольский[1], Д.Ю. Прокопов[1], А.Р. Шорина[3], Ю.В. Максимова[3]

[1] Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск
[2] Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, г. Новосибирск
[3] Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр, г. Новосибирск

При исследовании кариотипа классическими цитогенетическими методами нередко встает вопрос о происхождении и составе маркерных и дериватных хромосом. Часто несбалансированные перестройки, связанные с врожденными пороками развития и умственной отсталостью, обусловлены наличием/отсутствием сегментов эухроматина, которые определяют степень и форму патологии. В случае семей, отягощенных хромосомными аномалиями, очень важно оценить риск появления детей с дисбалансом кариотипа. Молекулярно-цитогенетические методы, такие как микродиссекция аномальных элементов, флуоресцентная *in situ* гибридизация, необходимы для полной и более качественной диагностики сложных хромосомных перестроек и верификации первичных диагнозов, поставленных на основании GTG-окрашивания. Для повышения качества прогнозирования вероятного развития расстройств необходимо максимально возможное описание фенотипических проявлений перестройки. Для этих целей хорошо подходит изучение и сравнение медицинских карт пациентов и в случае интеллектуальной недостаточности – исследование головного мозга методом магнитно-резонансной томографии. Это позволяет вовремя принять меры, направленные на медицинскую коррекцию физических пороков и повышает шансы на более качественную адаптацию и социализацию детей с аномалиями кариотипа.

Таким образом, комплексный подход, объединяющий медицинские обследования пациентов, анализ родословных и изучение кариотипа с помощью молекулярно-цитогенетических подходов обогащает пул данных о фенотипических проявлениях конкретных цитогенетических аномалий. Кроме того, полученные сведения позволяют прогнозировать вероятность рождения здоровых потомков.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 18-04-00826 А.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ В НЕЙРОНАХ С РЕЦИПРОКНЫМИ ХРОМОСОМНЫМИ МИКРОДЕЛЕЦИЯМИ И МИКРОДУПЛИКАЦИЯМИ

М.Е. Лопаткина[1], В.С. Фишман[2], М.М. Гридина[2], Н.А. Скрябин[1], Т.В. Никитина[1], А.А. Кашеварова[1], Л.П. Назаренко[1], О.Л. Серов[2], И.Н. Лебедев[1]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Актуальность. В настоящее время применение матричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH) позволяет исследователю проводить быстрый анализ всего генома с целью детекции хромосомного дисбаланса. Выявляемые при aCGH вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV), возникающие вследствие несбалансированных хромосомных перестроек – делеций и дупликаций, зачастую рассматриваются генетиками в качестве этиологического фактора развития хромосомных болезней [1]. В ряде случаев развитие микроделеционных и микродупликационных синдромов обусловлено разнонаправленным изменением копийности одного и того же участка ДНК.

Оценка гено-фенотипических корреляций нередко осложняется наличием нескольких генов, входящих в область перестройки, и недоступностью для анализа релевантного типа клеток. Выходом из сложившейся ситуации может стать изучение случаев реципрокных CNV, затрагивающих единственный ген (сужение круга кандидатных генов и изучение фенотипических эффектов разнонаправленного изменения копийности), а также применение технологии репрограммирования клеток, позволяющей получить целевой тип клеток для исследования [2]. Дальнейший полнотранскриптомный анализ позволяет выявить вызванные CNV изменения в работе клетки на молекулярном уровне и сделать предположение о вероятных молекулярных партнерах продукта изучаемого гена.

В ранее проведенных исследованиях нами было выявлено два уникальных случая реципрокных хромосомных аберраций в субсегменте 3p26.3, затрагивающих единственный ген *CNTN6*, экспрессирующийся преимущественно в центральной нервной системе (ЦНС) [3]. Настоящее исследование было направлено на полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с интеллектуальными нарушениями, имеющими либо дупликацию, либо делецию гена *CNTN6*.

Материал и методы. Для проведения исследования нами были дифференцированы в кортикальные нейроны две линии ИПСК от пациента с делецией *CNTN6*, две линии ИПСК от пациента с дупликацией *CNTN6*, нуллисомная линия ИПСК с нокаутом по нормальному аллелю *CNTN6*, получен-

ная из линии клеток с микроделецией *CNTN6*, и три линии ИПСК, полученные от двух здоровых индивидов с нормальным кариотипом. Тотальная РНК, выделенная из нейронов и мышиных глиальных клеток, на поверхности которых происходила дифференцировка ИПСК, была использована для полнотранскриптомного анализа на микрочипах SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K Microarray Kit (Agilent Technologies, США). Результаты микрочипового анализа были использованы в дальнейшем биоинформационном анализе с использованием пакета limma [4] и уровнем значимости (FDR) < 0,05; уровни экспрессии в группах сравнения отличались минимум в 2 раза. Для выявления функциональных групп генов был проведен анализ обогащения генов с помощью ресурса WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit.

Результаты. В ходе эксперимента было проведено сравнение уровней экспрессии генов в группе 1 «дупликация *CNTN6* – норма» (384 гипер- и 3138 гипоэкспрессирующихся генов), группе 2 «гетерозигота по делеции *CNTN6* – норма» (338 гипер- и 803 гипоэкспрессирующихся гена), группе 3 «гомозигота и гетерозигота по делеции *CNTN6* – норма» (289 гипер- и 713 гипоэкспрессирующихся генов), группе 4 «гомозигота по делеции *CNTN6* – гетерозигота по делеции *CNTN6*» (98 гипер- и 285 гипоэкспрессирующихся генов). В группах 1 и 2 были отмечены общие гены, однонаправленно изменяющие свою экспрессию (25 гипер- и 402 гипоэкспрессирующихся гена). Разнонаправленное изменение экспрессии (снижение в нейронах с дупликацией и повышение в нейронах с делецией *CNTN6*) было показано для 51 гена.

Анализ обогащения генов в разных группах сравнения показал вовлеченность продуктов дифференциально экспрессирующихся генов в различные биологические процессы (внутриклеточный транспорт, липидный обмен, детекция стимулов, реакция на вирусную инвазию, регуляция иммунного ответа и др.), однако в некоторых группах были значимо обогащены гены, принимающие участие в формировании ЦНС. Так, продукты гипоэкспрессирующихся генов в группах 1 и 2 участвуют в развитии и формировании нервной системы, нейрогенезе, генерации и дифференцировке предшественников нейронов, регуляции синаптической передачи, клеточного сигналлинга и постсинаптического мембранного потенциала. Наибольшее снижение экспрессии было показано для генов, кодирующих натрийактивируемый калиевый канал (*KCNT1*), транскрипционный фактор *PEG3* и белок-предшественник церебеллина 2 (*CBLN2*). Примечательно, что в случае клеток с нуллисомией по гену *CNTN6* (группа 4), гиперэкспрессированы были гены, продукты которых вовлечены в процессы развития центральной и парасимпатической нервной системы, черепных ганглиев, лицевого нерва и зубчатой извилины, а также преганглионарных волокон парасимпатической нервной системы. Наибольшее увеличение экспрессии было показано для генов, кодирующих митохондриальный белок CHCHD2 и белок, содержащий богатые лейцином повторы – *LRRC61*.

В группах сравнения 1 и 2 дифференциальная экспрессия была показана для 128 генов, экспрессирующихся преимущественно в ЦНС и участвующих в таких биологических процессах, как развитие структур мозга, формирование синапсов и синаптическая передача сигнала, аксональное наведение, глиогенез и нейропротекция. Мутации в ряде данных генов ассоциированы с развитием таких состояний, как задержка роста, лицевые дисморфизмы, умственная отсталость, микроцефалия, аутизм, шизофрения, биполярное и большое депрессивное расстройство, эпилепсия, понтоцеребеллярная гипоплазия и лиссэнцефалия.

Выводы. Данные о преимущественной экспрессии *CNTN6* в ЦНС и наличие множественных фенотипических проявлений у пациентов с CNV в регионе 3p26.3 (интеллектуальные нарушения, лицевые дисморфизмы, изменение формы черепа, аномалии скелета, кардиологические нарушения и др.) свидетельствуют о плейотропном действии данного гена, что, вероятно, связано с участием CNTN6 в различных сетях белковых взаимодействий. Показано, что нарушение копийности *CNTN6* влияет на изменение экспрессии целого ряда других генов, непосредственно не вовлеченных в перестройку, однако необходимых для нормального развития мозга. Дальнейший анализ наиболее сильно изменяющих свою экспрессию генов позволит детальнее изучить молекулярные механизмы патогенеза реципрокных синдромов микроделеции и микродупликации 3p26.3.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ «Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза хромосомных болезней» (№ 14-15-00772).

Литература

1. *Goldenberg P.* An Update on Common Chromosome Microdeletion and Microduplication Syndromes // Pediatr. Ann. 2018. V. 47, № 5. P. e198–e203.
2. *Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126, № 4. P. 663–676.
3. *Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al.* Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability // Mol. Cytogenet. 2014. V. 7 (1). P. 97.
4. *Ritchie M.E., Phipson B., Wu D. et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43 (7). P. e47.

КЛЕТОЧНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПРИ АНАЛИЗЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ПОРАЖЕННЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЯХ

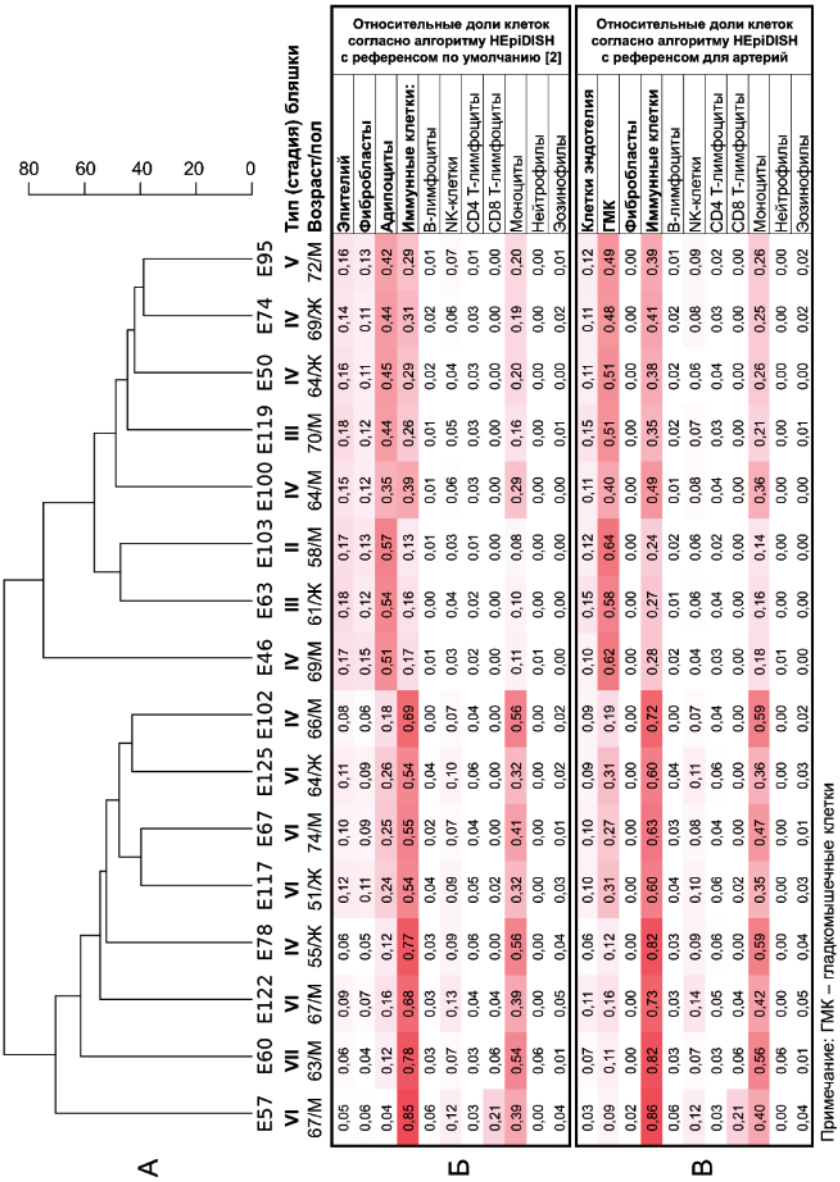
А.В. Марков[1], А.А. Зарубин[1], Д.В. Шарыш[1], А.Н. Казанцев[2], Н.Н. Бурков[2], О.Л. Барбараш[2], В.П. Пузырёв[1, 3], М.С. Назаренко[1, 2, 3]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово
[3] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Введение. В процессе развития атеросклероза происходят специфические изменения в метилировании ДНК в клетках артерий. Однако результаты разных исследований метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках *in vivo* слабо пересекаются, в том числе ввиду высокой клеточной гетерогенности образцов [1].

Цель работы – оптимизация алгоритма оценки и учета клеточной гетерогенности при анализе метилирования ДНК в образцах атеросклеротической бляшки.

Материал и методы. Образцы атеросклеротических бляшек сонных артерий (БСА), полученные от 16 пациентов (10 мужчин, 6 женщин, средний возраст (65 ± 6) лет), были использованы для гистологического исследования, включая иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание четырех образцов на маркеры гладкомышечных клеток (ГМК) – aSMA и макрофагов – CD68, а также для анализа метилирования ДНК на микрочипах Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina). Оценка клеточного состава образцов по профилям метилирования ДНК проводилась с по-



Кластеризация (А) и клеточный состав (Б, В) на основании профилей метилирования ДНК в образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий

мощью алгоритма HEpiDISH [2]. Дополнительно были привлечены данные из базы Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) и проекта ENCODE (https://www.encodeproject.org/).

Результаты. Кластерный анализ на основании метилирования 775836 CpG-сайтов выявил разделение образцов БСА на две группы (рисунок (А)), не объясняемые ни особенностями клинической картины заболевания, ни морфологией атеросклеротической бляшки.

С помощью алгоритма HEpiDISH было выявлено, что такая кластеризация соответствует расчетной фракции иммунных клеток в БСА (рисунок (Б)). Для уточнения количества других типов клеток, составляющих стенку артерии, мы создали собственный референсный набор CpG-сайтов, индекс метилирования которых специфичен для эндотелиальных клеток (GSE84395), фибробластов (GSE40699), ГМК (GSE40699, [3]) и иммунных клеток лейкоцитарного ряда (GSE35069). Фракции основных клеток артерий (в особенности ГМК) также объясняли кластеризацию образцов БСА (рисунок (В)). Пропорция CD68+-макрофагов по данным ИГХ приблизительно соотносилась с расчетной «моноцитарной» фракцией HEpiDISH (разница оценок двух методов – от 3 до 31%), тогда как для aSMA + ГМК было характерно занижение их относительного количества со стороны биоинформатического алгоритма относительно данных ИГХ на 25–47%.

Обсуждение и выводы. Паттерн метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий ассоциирован с количеством и составом клеток, составляющих бляшку. Приблизительный клеточный состав образца артерии человека может быть получен на основе данных о метилировании ДНК в нем. Валидация расчетного клеточного состава с помощью распространенных гистологических техник затруднена по ряду причин: неспецифическое окрашивание, анализ малой части клеток образца и т.д. Молекулярная классификация атеросклеротических бляшек имеет важное значение, а развитие подходов биоинформатического «разложения» образцов позволяет учитывать их клеточную гетерогенность и в перспективе находить изменения на уровне отдельных типов клеток.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Aavik E., Babu M., Ylä-Herttuala S.* DNA methylation processes in atherosclerotic plaque // Atherosclerosis. 2019. V. 281. P. 168–179.
2. *Zheng S.C., Webster A.P., Dong D. et al.* A novel cell-type deconvolution algorithm reveals substantial contamination by immune cells in saliva, buccal and cervix // Epigenomics. 2018. V. 10, № 7. P. 925–940.
3. *Jiang J.-X., Aitken K.J., Sotiropolous C. et al.* Phenotypic switching induced by damaged matrix is associated with DNA methyltransferase 3a (DNMT3A) activity and nuclear localization in smooth muscle cells (SMC) // PLoS ONE. 2013. V. 8 (8). P. e69089.

СТРУКТУРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МАЛЫХ СВЕРХЧИСЛЕННЫХ МАРКЕРНЫХ ХРОМОСОМ

Ж.Г. Маркова, М.Е. Миньженкова, А.А. Тарлычева, Н.В. Шилова

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

Малыми сверхчисленными маркерными хромосомами (мСМХ) принято называть дополнительные структурно аномальные хромосомы, равные по размеру или меньше хромосомы 20, которые невозможно однозначно идентифицировать стандартным цитогенетическим методом (GTG-окрашивание). Среди новорожденных частота носителей мСМХ в популяции составляет 0,044% [1].

Фенотипы, связанные с наличием мСМХ в кариотипе, варьируют от нормального до значительного отклонения в физическом и психомоторном развитии. К синдромальным формам мСМХ относятся: синдром мозаичной тетрасомии 12p (синдром Паллистера – Киллиана), синдром тетрасомии 18(p), синдром кошачьего глаза (синдром частичной тетрасомии хромосомы 22), синдром сверхчисленной хромосомы der(22)t(11;22) (синдром Эмануэль). В остальных случаях фенотипические проявления зависят от хромосом, участвующих в образовании мСМХ, наличия эухроматиновых сегментов, присутствующих в них генов, уровня мозаицизма, наличия однородительской дисомии и присутствия различных аллелей генов, входящих в состав конкретной мСМХ [2].

Известно, что мСМХ могут быть производными любой из 24 хромосом человека и морфологически представлены в виде инвертированных дупликаций (inv dup), кольцевых (r) и минутных (min) хромосом. Формирование мСМХ возможно при реализации различных механизмов, что приводит к структурной гетерогенности этой группы дериватных хромосом. Так, образование мСМХ в виде инвертированных дупликаций может быть следствием внутрихромосомного или межхромосомного обмена U-типа между гомологичными хромосомами при неравном кроссинговере во время мейоза; возникновения разрыва в кольцевой хромосоме или обратной дупликации центрической минутной хромосомы. Минутные мСМХ могут возникать в результате коррекции трисомии, коррекции моносомии и постзиготических ошибок клеточного деления. Существование нескольких морфологических форм мСМХ возможно при трансфекции в ядро зиготы деградировавших при протеолизе хромосом из излишних гаплоидных пронуклеусов при двойном оплодотворении или реабсорбции второго полярного тельца. Кольцевые мСМХ чаще всего формируются в процессе «эволюции» кариотипа как более стабильные структуры. Возможно формирование кольцевой мСМХ вследствие интерстициальной делеции и образования неоцентромеры при сбалансированной перестройке [1].

Применение молекулярно-цитогенетических методов исследования, в том числе различных вариантов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), позволяет идентифицировать и охарактеризовать мСМХ [3]. Использование комплексного молекулярно-цитогенетического подхода дало возможность определить происхождение и генетическую структуру аутосомных мСМХ у 85 пациентов.

В 44 случаях (52%) мСМХ являлись производными акроцентрических хромосом и представляли собой различные варианты инвертированных дупликаций. В 23 случаях мСМХ оказались производной хромосомы 15, 14 из которых содержали только гетерохроматин короткого плеча хромосомы 15, в девяти присутствовали эухроматиновые районы 15q12-q13, в одном случае мСМХ с неоцентромерой включала эухроматиновый район 15q25.3-qter. В пяти случаях inv dup(22)(q11) мСМХ содержали эухроматиновые районы и представляли собой синдромальную форму – частичную тетрасомию хромосомы 22 (синдром кошачьего глаза) (OMIM 115470). Остальные производные акроцентрических хромосом содержали только прицентромерный гетерохроматин хромосом 14 или 22 (10 случаев) и 13 или 21 (пять случаев).

Исключением стали два случая мСМХ, когда производные хромосом 21 и 22 представляли собой кольцевые хромосомы.

Производные неакроцентрических хромосом и композитные мСМХ идентифицированы в 41 случае (48%). Большинство из них приходится на долю мСМХ в виде изохромосом двух синдромальных форм: в пяти случаях – синдром изохромосомы 18p (OMIM 614290), в 19 случаях – синдром мозаичной тетрасомии 12p (синдром Паллистера – Киллиана, OMIM 601803). Проблемой цитогенетической диагностики синдрома Паллистера – Киллиана является наличие тканеспецифичного мозаицизма. Известно, что в культуре лимфоцитов периферической крови у этих пациентов обнаруживается только 0–2% аберрантных клеток, поэтому при стандартном цитогенетическом исследовании кариотип определяется как нормальный [4]. Верификация клинического диагноза синдрома Паллистера – Киллиана осуществлялась при проведении интерфазной FISH в прямых препаратах из клеток крови и в препаратах из клеток буккального эпителия, что позволило идентифицировать наличие сверхчисленной хромосомы i(12)(p10) и оценить частоту аберрантного клона в разных тканях.

Остальные 17 мСМХ присутствовали в виде кольцевых хромосом, инвертированных дупликаций (в том числе с неоцентромерой), несбалансированной транслокации.

Таким образом, мСМХ являются морфологически и генетически гетерогенной группой хромосомных аберраций, выявление и характеристика которых возможна только с использованием комплексного молекулярно-цитогенетического подхода. Идентификация каждого случая носительства мСМХ является неотъемлемой частью медико-генетического консультирования семьи.

Литература

1. *Liehr T.* (Ed.). Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) a guide for human geneticists and clinicians; with contributions by unique (The Rare Chromosome Disorder Support Group). Heidelberg, Dordrecht, London, New York: Springer, 2012.
2. *Jafari-Ghahfarokhi H., Moradi-Chaleshtori M., Liehr T. et al.* Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes // Adv. Biomed. Res. 2015. V. 4. P. 140.
3. *Liehr T., Trifonov V., Polityko A. et al.* Characterization of small supernumerary marker chromosomes by a simple molecular and molecular cytogenetics approach // Balkan J. Med. Genet. 2007. V. 10. P. 33–37.
4. *Karaman B., Kayserili H., Ghanbari A. et al.* Pallister–Killian syndrome: clinical, cytogenetic and molecular findings in 15 cases // Mol. Cytogenet. 2018. V. 11. P. 45.

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ФАКТОРОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А.В. Мейер[1], Т.А. Толочко[1], В.И. Минина[2], А.А. Тимофеева[2], А.В. Ларионов[1]

[1] *Кемеровский государственный университет, г. Кемерово*
[2] *Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово*

Пыль угольных шахт состоит из угольно-породных частиц, способных вызывать альтерацию дыхательных путей и клеток буккального эпителия. В результате стимуляции фагоцитоза образуются активные формы кислорода, которые как непосредственно, так и путем активации перекисного окисления липидов способны индуцировать повреждения ДНК, пролиферативные и деструктивные изменения клеток. Наряду с угольной пылью кластогенные эффекты в различных типах клеток горнорабочих могут быть связаны с воздействием радиации, полициклических ароматических углеводородов, оксида азота, метана, оксида углерода, сероводорода, вибрации и др. С **целью** оценки влияния профессиональных факторов на цитогенетический статус горнорабочих шахты Березовской (Кемеровская область) проведено исследование частоты и спектра хромосомных аберраций в метафазных пластинках и уровня повреждения ДНК с использованием метода анализа ДНК-комет в лимфоцитах периферической крови, а также развернутый микроядерный тест в буккальных эпителиоцитах.

Материалом для исследования послужили образцы периферической крови и буккальных эпителиоцитов от 97 стажированных шахтеров (средний возраст (48,9 ± 0,6) года, стаж работы под землей – минимум 10 лет) и от 169 лиц мужского пола (средний возраст (50,5 ± 0,5) года), профессиональная деятельность которых не связана с воздействием генотоксических факторов. От всех доноров было

получено информированное согласие на проведение исследования. С целью исключения возможного влияния медиаторов воспаления на результаты исследования в обследуемые контингенты включены мужчины без острых и хронических воспалительных заболеваний. Метод анализа ДНК-комет выполнялся в щелочной модификации, разработанной N.P. Singh и соавт. [1]. Цитологические препараты буккального эпителия готовились по методическим рекомендациям, изложенным в работе P. Thomas и соавт. [2] с некоторыми модификациями. Культивирование лимфоцитов крови и подготовку препаратов для анализа аберраций хромосом проводили согласно методике P.A. Hungerford [3].

Результаты. Сравнительный анализ средних значений показателей по включенным в исследование тест-системам выявил статистически значимые повышения уровня отдельных типов повреждений в группе шахтеров относительно контрольной выборки (таблица).

Значимые отличия средних значений показателей метода учета хромосомных аберраций, метода анализа ДНК-комет в лимфоцитах и микроядерного теста в буккальных эпителиоцитах

Показатель	Контроль, *M* (95% *CI*)	Случай, *M* (95% *CI*)	*p*
Метод учета хромосомных аберраций			
Аберраций на 100 клеток, %	2,13 (1,03–1,45)	4,69 (2,66–3,45)	<0,0001
Одиночные фрагменты, %	1,46 (0,85–1,19)	2,67 (2,07–2,68)	0,0019
Аберрации хроматидного типа, %	1,47 (0,86–1,20)	2,69 (2,08–2,69)	0,0019
Парные фрагменты, %	0,38 (0,36–0,51)	1,26 (0,98–1,27)	<0,0001
Дицентрики без фрагмента, %	0,04 (0,12–0,18)	0,22 (0,38–0,49)	0,0001
Межхромосомные обмены, %	0,28 (0,42–0,59)	0,52 (0,53–0,69)	0,0021
Аберрации хромосомного типа, %	0,63 (0,54–0,76)	1,99 (1,35–1,75)	<0,0001
Метод анализа ДНК-комет			
Доля ДНК в хвосте кометы, %	2,16 (1,25–3,08)	4,33 (3,70–4,97)	<0,0001
Момент хвоста кометы, %	0,51 (0,05–0,97)	1,37 (1,04–1,69)	0,0011
Момент хвоста Оливе, %	0,77 (0,32–1,22)	1,91 (1,60–2,23)	<0,0001
Микроядерный тест в буккальных эпителиоцитах			
Микроядро, ‰	0,23 (0,75–1,09)	1,44 (1,83–2,43)	<0,0001
Двуядерность, ‰	3,82 (4,23-6,15)	6,26 (4,21–5,59)	<0,0001
Насечка, ‰	1,81 (1,81–2,63)	3,79 (2,30–3,06)	<0,0001
Сдвоенное ядро, ‰	4,59 (2,89–4,20)	5,97 (3,49–4,64)	0,0339
Кариорексис	2,96 (8,5–12,53)	4,98 (5,12–6,77)	<0,0001
Лизис мембраны	4,15 (4,60–6,82)	8,28 (6,38–8,48)	0,0001
Апоптозные тела	0,04 (0,16–0,24)	0,75 (1,17–1,56)	<0,0001

Примечание. *M* – среднее значение; 95% *CI* – 95%-й доверительный интервал; *p* – уровень значимости *U*-критерий Манна – Уитни.

Ранжирование результатов исследования, полученных методом анализа ДНК-комет, в контрольной группе позволило установить, что значения от 0,96 до 3,15% содержания ДНК в хвосте кометы укладываются в границы 25–75‰ (P_{25}–P_{75}). Данные параметры были приняты как фоновые. Доля лиц, имеющих значения показателя выше фонового, в группе шахтеров составила 52,13%, а в группе сравнения – 26,09% (χ^2 = 8,52; p = 0,004). Относительно результатов, полученных с использованием микроядерного теста, пределы значений частот выявления микроядер для P_{25}–P_{75} составили 0–1‰. Доля лиц с частотой выявления микроядер выше 1‰ в группе шахтеров составила 36,08%, а в контрольной группе – 5,36% (χ^2 = 17,95; p < 0,0001). Доля шахтеров с уровнем частоты хромосомных аберраций выше 3% (фоновое значение для Кемеровской области) составила 62,93%, для группы сравнения значение данного показателя составило 17,65% (χ^2 = 35,37; p < 0,0001).

Корреляционный анализ показателей, включенных в исследование трех тест-систем, выявил наличие слабой положительной корреляции доли ДНК в хвосте с протрузиями типа «пузырек» (r = 0,3336) и с атипичной формой ядра (r = 0,2835) в буккальных эпителиоцитах, а также с частотой выявления мультиаберрантных клеток в лимфоцитах (r = 0,2741). Отсутствие выраженных корреляционных связей может быть обусловлено различной разрешающей способностью включенных в исследование методов в отношении выявления повреждений ДНК, а также индивидуальной чувствительностью к воздействию мутагенных факторов, обусловленной генотипическими и конститутивными особенностями.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают целесообразность использования комплекса методов для оценки мутагенных эффектов воздействия производственных факторов угледобывающих предприятий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-44-420017 р-а.

Литература

1. *Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Exp. Cell Res. 1988. V. 175. P. 184–191.
2. *Thomas P., Hollad N., Bolognesi C. et al.* Buccal micronucleus cytome assay // Nat. Protoc. 2009. V. 4. P. 825–837.
3. *Hungerford P.A.* Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. 1965. V. 40. P. 333–338.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СИНДРОМА ПАЛЛИСТЕРА – КИЛЛИАНА С ЧАСТИЧНОЙ ТРИСОМИЕЙ 12Р

Л.И. Минайчева[1], Л.П. Назаренко[1], А.А. Кашеварова[1], Н.А. Скрябин[1], М.Е. Лопаткина[1], А.Д. Черемных[1], Ю.С. Яковлева[1,2], Г.Н. Сеитова[1], И.Н. Лебедев[1]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Синдром Паллистера – Киллиана – спорадический синдром множественных врожденных аномалий, ассоциированных с умственной отсталостью. Случаи заболевания редки, однако его частота значительно недооценена. Это обстоятельство связано с ранней неонатальной гибелью новорожденных с врожденной диафрагмальной грыжей (данный порок развития является специфичным и частым при синдроме Паллистера – Киллиана), а также в связи с проблемой цитогенетической диагностики заболевания вследствие тканевого мозаицизма по изохромосоме 12р.

Семья с ребенком обратилась на прием к генетику. Возраст пациента – 1 год 9 месяцев, рост – 84 см, масса тела – 13 кг. Ребенок от первой беременности, срочных оперативных родов (масса тела – 4 200 г, длина – 57 см). Врожденный порок развития – полидактилия правой стопы – был выявлен пренатально при ультразвуковом исследовании плода во втором триместре беременности. От проведения инвазивной диагностики с целью исключения хромосомной патологии семья отказалась.

При рождении ребенка были отмечены преаксильная полидактилия и синдактилия II, III, IV пальцев обеих стоп, синдактилия II, III пальцев кистей рук, лицевые дисморфии. Нервно-психическое и моторное развитие протекало с задержкой: начал сидеть в 1 год, ползать в 1 год 6 месяцев, ходить в 1 год 7 месяцев, речь отсутствует. Ребенок наблюдался у невролога по месту жительства с диагнозом «перинатальная энцефалопатия, гипертензионный синдром, легкий тетрапарез, задержка психомоторного развития».

При осмотре пациента выявлены следующие пороки развития и лицевые дисморфии: макроцефалия, выступающий лоб с высокой линией роста волос, отсутствие волос в лобно-височной области, уплощенное лицо, широкая и плоская переносица, гипертелоризм, монголоидный разрез глаз, эпикант, плоское широкое основание носа, короткий нос с вывернутыми ноздрями, длинный фильтр, тонкая верхняя губа с формой «лук Купидона», микрогнатия, большие оттопыренные уши, короткая шея, широкие кисти рук и стопы, поперечная ладонная складка, преаксильная полидактилия и синдактилия II, III, IV пальцев обеих стоп, синдактилия II, III пальцев кистей рук. Телосложение пропорциональное, укорочения конечностей нет, кожные покровы обычной окраски, гипо- и гиперпигментация отсутствует. У ребенка выраженная задержка психического развития. Отмечалось замедленное прорезывание зубов – с 1 года 6 месяцев.

Пороков развития внутренних органов у пациента не выявлено. Проведена магнитно-резонансная томография головного мозга и обнаружены следующие признаки: уменьшение объема белого вещества головного мозга; многочисленная очаговая и перивентрикулярная лейкопатия, гипоплазия мозолистого тела; умеренное расширение наружных и внутренних пространств заместительного характера.

При осмотре у матери пациента отмечены синдактилия III, IV пальцев левой кисти (оперирована), большие оттопыренные уши (проведена отопластика), уплощенное лицо, широкая, плоская переносица, гипертелоризм, монголоидный разрез глаз, эпикант, плоское широкое основание носа, высокий фильтр, форма верхней губы «лук Купидона», пупочная грыжа, паховая грыжа двусторонняя (оперирована). Умственной отсталости нет.

У родного брата матери пациента имеется синдактилия III, IV пальцев левой кисти (со слов, не осмотрен). Умственной отсталости нет.

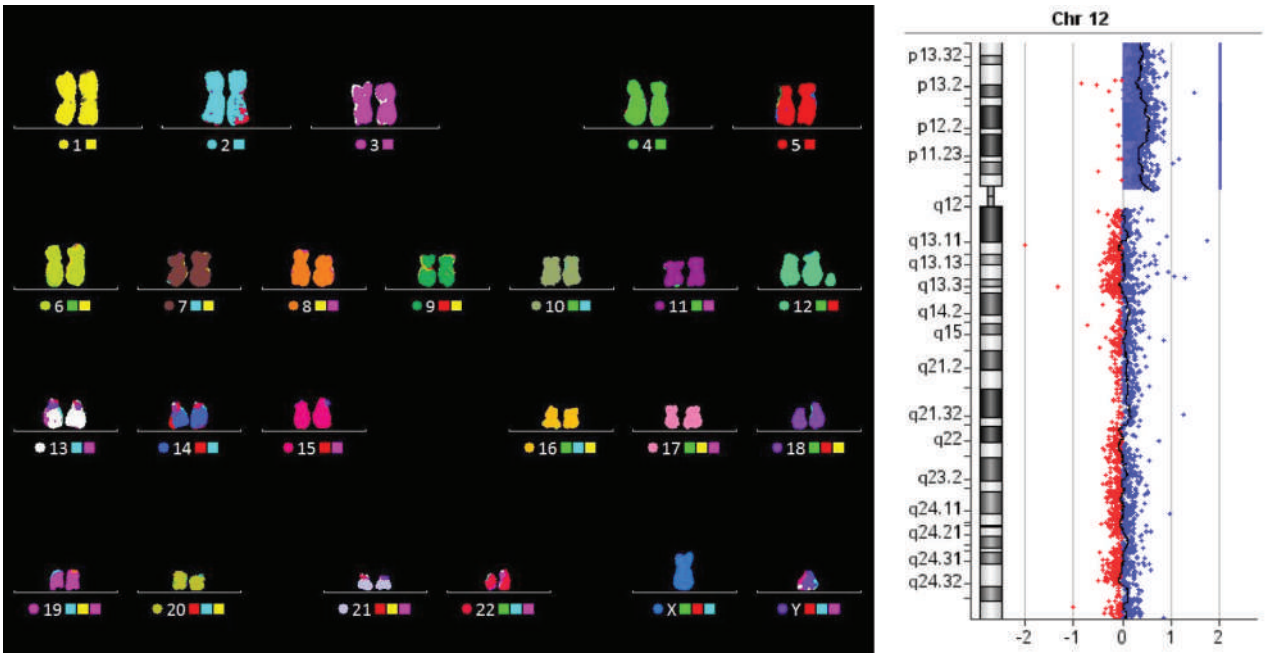
У дедушки по материнской линии преаксиальная полидактилия стоп, синдактилия I, II пальцев стоп (со слов, не осмотрен). Умственной отсталости нет.

Родители кровное родство отрицают. Других случаев врожденных пороков развития, а также умственной отсталости в родословной не выявлено.

В результате цитогенетического исследования лимфоцитов периферической крови в кариотипе пробанда выявлена сверхчисленная маркерная хромосома в мозаичном состоянии с клеточной линией с нормальным кариотипом: 47,XY,+mar[10]/46,XY [10]. Применение мультицветной флуоресцентной *in situ* гибридизации (mFISH) с ДНК-зондом «24XCyte Human Multicolor FISH (mFISH) Probe Kit» (Metasystems, Германия) позволило установить, что маркерная хромосома является дериватом хромосомы 12 (рис. 1,а). Последующий микроматричный анализ (array-CGH) на микрочипах SurePrint G3 Human CGH 8×60K (Agilent Technologies, США) подтвердил происхождение маркера от хромосомы 12

и выявил две перекрывающиеся по геномным координатам дупликации 12p13.33-p11.1 и 12p13.1-p12.1 размером 34 и 9 Mb соответственно (рис. 1,б). Это может свидетельствовать о наличии мозаицизма по структуре дуплицированных регионов и требует дополнительных молекулярно-цитогенетических исследований. С помощью количественной ПЦР в режиме реального времени с праймерами на экзон 4 гена *LDHB* (12p12.1) и экзон 3 гена *SYT10* (12p11.1) было установлено, что обе дупликации возникли *de novo*. В результате проведенных исследований кариотип пациента был обозначен как 47,XY,+der(12).ish wcp(24XCyte)[10]/46,XY.ish wcp(24XCyte)[10].arr[hg19] 12p13.33-p11.1(230421-34345585)×3 dn,12p13.1-p12.1(13828759-22784758)×3 dn.

Кариотип родителей нормальный и не содержит числовых и видимых структурных нарушений хромосом.



а *б*

Молекулярно-цитогенетическое исследование кариотипа пациента с маркерной хромосомой 12 и клинической картиной синдрома Паллистера – Киллиана: *а* – мультицветная флуоресцентная *in situ* гибридизация (mFISH); *б* – гибридизационный профиль хромосомы 12 по данным array-CGH

Классический вариант синдрома Паллистера – Киллиана обусловлен присутствием в кариотипе пациентов сверхчисленной изохромосомы по короткому плечу хромосомы 12 в мозаичном состоянии, ограниченном некоторыми тканями. Однако у небольшого числа пациентов с клинической картиной данного заболевания описаны полные или частичные дупликации 12p, возникающие вследствие интерстициальных дупликаций или несбалансированных транслокаций [1]. С другой стороны, у некоторых носителей частичных трисомий 12p фенотип может вовсе не соответствовать синдрому Паллистера – Киллиана. Все это дает основание предположить, что на коротком плече хромосомы 12 могут иметься гены, ответственные за формирование клинической картины синдрома, трисомия по которым в немозаичном состоянии эквивалентна, в терминах патогенетической значимости, мозаичной тетрасомии, возникающей при изохромосоме i(12)(p10) [1]. Соответственно, накопление сообщений о частичных дупликациях 12p у пациентов с клинической картиной синдрома Паллистера – Киллиана может способствовать выделению кандидатных генов заболевания. Обследованный нами пациент имеет две протяженные перекрывающиеся дупликации, захватывающие целое короткое плечо хромосомы 12, что не позволяет выделить какой-либо минимальный критический регион. В то же время обращает на себя внимание наличие преаксиальной полидактилии, не характерной для данного заболевания, но которая ранее была отмечена у пациента с частичной гексасомией 12p, имеющем в кариотипе две изохромосомы i(12)(p10) в мозаичном состоянии [2]. Не исключено, что регион перекрывания двух дупликаций у нашего пациента 12p13.1-p12.1 может содержать кандидатные гены для этого фенотипического признака.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Izumi K., Conlin L.K., Berrodin D. et al.* Duplication 12p and Pallister–Killian syndrome: A case report and review of the literature toward defining a Pallister–Killian syndrome minimal critical region // Am. J. Med. Genet. Part A. 2012. V. 158A. P. 3033–3045.
2. *Vogel I., Lyngbye T., Nielsen A. et al.* Pallister–Killian syndrome in a girl with mild developmental delay and mosaicism for hexasomy 12p // Am. J. Med. Genet. Part A. 2009. V. 149A. P. 510–514.

ОЦЕНКА ХРОМОСОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ У РАБОЧИХ УГОЛЬНЫХ ШАХТ И УГОЛЬНЫХ ТЕПЛОЭЛЕКТРОСТАНЦИЙ

В.И. Минина, М.Л. Баканова, Я.А. Савченко, А.А. Тимофеева, А.В. Рыжкова, А.Н. Глушков

Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово

Условия труда на угольных предприятиях характеризуются выраженным негативным воздействием на организм рабочих. В настоящее время активно изучаются различные генетические биомаркеры эффекта воздействия производственной среды на организм человека (молекулярные, молекулярно-цитогенетические, кариологические и классические цитогенетические тесты). Наиболее богатый материал накоплен в результате анализа нестабильных структурных хромосомных аберраций в лимфоцитах крови. Отмечено повышение уровня повреждений хромосом у рабочих некоторых угольных предприятий [1, 2]. При этом отмечено, что интенсивность хромосомного мутагенеза зависит от конкретных производственных условий и конституциональных особенностей организма, определяемых генетическим полиморфизмом ферментов. В связи с этим **целью данного исследования** явился сравнительный анализ хромосомной нестабильности и полиморфизма генов у рабочих угольных шахт и теплоэлектростанций, работающих на угле.

Было обследовано 1 295 жителей Кемеровской области, в том числе 288 шахтеров, проработавших под землей не менее 10 лет (проходчики, горнорабочие очистного забоя, горные мастера), 365 рабочих угольной теплоэлектростанции (энергетики, слесари, машинисты, проработавшие в основных производственных цехах ТЭЦ не менее 10 лет). Гигиеническая характеристика предприятий проводилась на основе данных государственных докладов о состоянии окружающей природной среды в Кемеровской области и сведений заводских промышленных лабораторий. В исследование включались здоровые рабочие после прохождения полного медицинского осмотра. Критерий исключения – наличие профессионально обусловленной патологии. В контрольную группу включены 642 здоровых жителя той же местности, близкого половозрастного состава, не работавших на промышленных предприятиях. Материалом для исследования служила цельная периферическая кровь. Проводили культивирование клеток крови, подготовку препаратов и учет аберраций хромосом. ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Типирование полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NAT2*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4*, *OGG1*, *APEX1*, *PARP1*, *NBS1*, *ATM*, *XPD*, *XPC*, *XPG*, *LIG4*, *MTHFR*, *MTR*, *TNF*, *MNSOD*, *CAT*, *GPX1*, *CHEK2*, *EPHX1*, *MMP1*, *TGFB*, *EGFR*, *TP53* проводили с помощью real-time PCR с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Для исследования межгенных взаимодействий использовали метод Multifactor Dimensionality Reduction (MDR).

У 94% обследованных угольщиков в лимфоцитах крови были выявлены аберрации хромосом. Частота ХА как в группе шахтеров ((4,06 ± 0,15)%), так и рабочих теплоэлектростанций ((3,18 ± 0,09)%) была значимо выше, чем в контроле ((1,53 ± 0,05)%, $p < 0{,}00001$). Наиболее высокий уровень ХА отмечен у шахтеров (отличия между шахтерами и энергетиками были статистически значимы, $p < 0{,}0001$). Наблюдаемые неблагоприятные эффекты у шахтеров и рабочих теплоэлектростанций могут быть связаны с воздействием специфического комплекса факторов производственной среды, включающего в себя угольную пыль в высоких концентрациях (среднесменная концентрация пыли на рабочем месте у шахтеров-проходчиков – 96,6 мг/м³; горнорабочих очистного забоя – 68,1 мг/м³; электрослесарей – 51,2 мг/м³; у машинистов теплоэлектростанции – 23 мг/м³; у слесарей – 11 мг/м³), сверхнормативное воздействие радона (выше 200 Бк/м³), присутствие тяжелых металлов, полициклических ароматических углеводородов и других летучих опасных соединений, изменение газового состава воздуха; а также производственный шум, вибрация, неблагоприятный микроклимат, физические нагрузки.

Анализ качественного спектра повреждений хро-мосом показал, что различия между рабочими и контролем коснулись всех основных видов аберраций (хроматидного и хромосомного типов). Причем аберрации хромосомного типа (парные фрагменты, дицентрические и кольцевые хромосомы, инверсии и транслокации) регистрировались у рабочих в 2 раза чаще, чем в контроле. Интересным оказался факт сходства высокого уровня аберраций хромосомного типа в изученных производственных группах (1,69% у шахтеров и 1,62% у энергетиков). Это свидетельствует о выраженном воздействии мутагенов лучевой природы на рабочих как при добыче угля, так и при его сжигании в условиях ТЭЦ.

В результате сопоставления молекулярно-генетических и цитогенетических характеристик было установлено, что формирование повышенного уровня повреждений хромосом у шахтеров преимущественно связано с генетическими вариантами: *XPD* rs13181, *XRCC4* rs2075685, *TGFB* rs1800469; у рабочих теплоэлектростанций – с вариантами генов: *XPD* rs13181 и *TGFB* rs1800469. Анализ межгенных взаимодействий показал, что значимую роль в реализации генотоксических эффектов производственной среды угольных шахт играют сочетания вариантов генов, контролирующих биотрансформацию ксенобиотиков (*CYP1A1* (2455A>G) – *CYP1A2* (-163C>A) – *GSTP1* (313A>G) – *GSTM1* (del)), антиоксидантную защиту клетки (*MNSOD* (47C>T) – *GPX1* (599C>T) – *CAT* (262C<T)), репарацию ДНК (*ADPRT* (2285T>C) – *ATM* (5557G>A) – *XRCC1* (1196A>G) и *XPG* (3310G>C) – *ADPRT* (2285T>C) – *XPC* (2815A >C)); угольных теплоэлектростанций – *APEX1* (444T>G) – *OGG1* (977C>G) – *ADPRT* (2285T>C); *XPD* (2251T>G) – *ADPRT* (2285T>C) – *OGG1* (977C>G); *TP53* (215G>C) – *CAT* (262C>T) – *XRCC4* (-1394G>T); *CYP1A1*

(3801T>C) – *CYP1A2* (-163C>A) – *GSTT1* – *GSTM1; CYP1A2* (-163C>A) – *GSTP1* (313A>G) – *GSTM1.*

Сравнивая паттерны генетических маркеров, связанных с хромосомной нестабильностью в группах шахтеров и энергетиков, можно отметить черты сходства: значимый вклад полиморфных вариантов генов ферментов репарации (*XPD*, *ADPRT),* генов, участвующих в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза (*TGFB*, *TP53*), генов, координирующих антиоксидантную защиту клетки (*CAT*), биотрансформацию ксенобиотиков (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTP1*, *GSTM1).* Особое внимание привлек локус *XPD* rs13181, для которого ранее была показана значимая ассоциация с высоким риском формирования рака легкого у жителей той же местности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00034.

Литература

1. *Ada A.O., Demiroglu C., Yilmazer M. et al.* Cytogenetic damage in Turkish coke oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons: Association with *CYP1A1*, *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* gene polymorphisms // Arh. Hig. Rada Toksikol. 2013. V. 64 (3). P. 359–369.
2. *Volobaev V.P., Sinitsky M.Y., Larionov A.V. et al.* Modifying influence of occupational inflammatory diseases on the level of chromosome aberrations in coal miners // Mutagenesis. 2016. V. 31 (2). P. 225–229.

ЭТИОПАТОГЕНЕЗ АНОМАЛЬНОГО ФЕНОТИПА ПРИ *DE NOVO* СБАЛАНСИРОВАННЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ

М.Е. Миньженкова, Ж.Г. Маркова, Н.В. Шилова

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

Сбалансированные хромосомные перестройки – группа структурных аномалий, характеризующихся изменением локализации и (или) ориентации геномных участков без видимых сопутствующих изменений копийности материала ДНК. При стандартном цитогенетическом анализе они отмечаются как инверсии, инсерции, транслокации и сложные комплексные хромосомные перестройки, включающие комбинации этих событий. Приблизительно каждый двухтысячный новорожденный имеет *de novo* сбалансированную хромосомную перестройку. Несмотря на то что в большинстве случаев носительство сбалансированных структурных хромосомных перестроек не ассоциируется с аномальным фенотипом и интеллектуальными нарушениями, риск врожденных аномалий в этой группе в два-три раза превышает таковой в общей популяции [1].

Одним из самых простых объяснений фенотипических отклонений при сбалансированном состоянии кариотипа является наличие «скрытого» геномного дисбаланса и более сложных комплексных перестроек хромосом [2]. Диагностика таких хромосомных аномалий стала возможной с внедрением в цитогенетическую практику микроматричной сравнительной геномной гибридизации (array-CGH). Использование высокоразрешающей технологии хромосомного микроматричного анализа помогло определить, что более чем в 40% случаев носительства сбалансированных хромосомных перестроек причиной аномального фенотипа являлось наличие микроделеций/микродупликаций, ассоциированных с точками разрывов при перестройках либо находящихся в относительной близости с точками разрывов (0,2–10 млн п.н.), а в 20% случаев наблюдались микроделеции/микродупликации на хромосомах, не задействованных в перестройках [3, 4]. Логично предположить, что микроделеции/микродупликации, ассоциированные с точками разрывов, вероятнее всего, произошли в ходе формирования хромосомной перестройки, в то время как микроструктурные аномалии, обнаруженные на расстоянии от точек разрывов либо на хромосомах, не участвующих в перестройках, могут быть не связаны с существующими сбалансированными перестройками хромосом и отражают комплексную природу формирования аномального фенотипа.

В случае отсутствия геномного дисбаланса при проведении хромосомного микроматричного анализа диагностика причин аномального фенотипа должна быть продолжена молекулярными методами исследования более высокого разрешения. В частности, технология высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing (NGS)) позволяет расширить границы детекции хромосомного дисбаланса и обеспечить высокоразрешающий анализ кариотипа на молекулярном уровне. Картирование и секвенирование точек разрывов при сбалансированных хромосомных перестройках, анализ мутаций и генной экспрессии позволяют отобразить этиопатогенез вариабельного аномального фенотипа в каждом конкретном случае [4, 5].

Во-первых, сбалансированные хромосомные перестройки могут провоцировать нарушение структурно-функциональной целостности дозозависимых генов и активировать следующие молекулярные механизмы:

– перестроенный сегмент может содержать один или несколько активно транскрибируемых генов, что непосредственно приводит к функциональной анеусомии по дозозависимым генам;

– изменение локализации и (или) ориентации хромосомного материала может нарушить последовательность генов и привести к потере или усилению их функции;

– делеция или дупликация во фланкирующей области гена может привести к аномальной экспрессии генов из-за эффекта положения.

Во-вторых, точки разрывов при сбалансированных хромосомных перестройках могут находиться во внутригенных областях и влиять на регуляцию близлежащих генов путем реорганизации регуля-

торных топологических ассоциированных доменов (ТАД). Метод анализа трехмерной конформационной организации хроматина (High-Throughput Chromosome conformation capture (Hi-C)) позволяет охарактеризовать пространственную систему взаимодействия элементов между различными участками целого генома [5]. Отмечено, что объединение ТАД в результате утраты разделяющего их участка ДНК приводит к существенным нарушениям экспрессии генов и, следовательно, является патогенетическим механизмом формирования аномального фенотипа.

Таким образом, комплексный подход с использованием современных высокоразрешающих молекулярно-цитогенетических и молекулярных технологий открыл новые возможности для описания этиопатогенеза аномального фенотипа при *de novo* сбалансированных хромосомных перестройках.

Литература

1. *Warburton D. De novo* balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints // Am. J. Hum. Genet. 1991. V. 49 (5). P. 995–1013.
2. *De Gregori M., Ciccone R., Magini P. et al.* Cryptic deletions are a common finding in «balanced» reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients // J. Med. Genet. 2007. V. 44. P. 750–762.
3. *Schluth-Bolard C., Delobel B., Damien S. et al.* Cryptic genomic imbalances in *de novo* and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated // Eur. J. Med. Genet. 2009. V. 52. P. 291–296.
4. *Higgins A.* Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the Developmental Genome Anatomy Project // Am. J. Hum. Genet. 2008. V. 82. P. 712–722.
5. *Redin C., Brand H., Collins R.L. et al.* The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies // Nat. Genet. 2017. V. 49 (1). P. 36–45.

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИЧЕСКОГО МОЗАИЦИЗМА КОЛЬЦЕВЫХ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Т.В. Никитина[1], А.А. Кашеварова[1], А.Г. Мензоров[2, 3], Ю.С. Яковлева[1, 4], С.А. Васильев[1], М.Е. Лопаткина[1], М.М. Гридина[2], А.А. Хабарова[2], М.А. Распопова[4], И.Е. Пристяжнюк[2], О.Л. Серов[2, 3], И.Н. Лебедев[1 ,4]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
[3] Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск
[4] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Кольцевые хромосомы (КХ) встречаются с частотой 1 случай на 50–100 тыс. населения. Фенотипы носителей КХ варьируют от значительных пороков развития и нарушений интеллекта до минимальной задержки роста при отсутствии других аномалий. Было высказано предположение, что причиной такого разнообразия фенотипических проявлений могут быть особенности прохождения КХ через митоз, при котором в зависимости от числа сестринских хроматидных обменов могут образовываться сцепленные и дицентрические кольца. В результате ткани носителей КХ часто являются мозаиками по наличию КХ и их производных: дицентрических или открытых колец, нескольких КХ в одной клетке и хромосомных фрагментов, то есть возникает «динамический тканеспецифический мозаицизм». На фенотипическое проявление КХ могут влиять как размер и генный состав кольца, так и жизнеспособность клеток с соответствующей моносомией или аберрантными кольцами. Однако экспериментальной проверки того, какие факторы определяют возникновение и разнообразие тканевого мозаицизма, пока не проводилось. Исследование *in vitro* динамического мозаицизма КХ в активно делящихся клетках, какими являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), может пролить свет на особенности «поведения» КХ в митозе. Мы проводили анализ стабильности числа и размеров КХ 13 и 22 в плюрипотентных клетках, полученных от пациентов с соответствующими аберрациями.

С помощью экзогенной экспрессии транскрипционных факторов KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC человека при использовании лентивирусных векторов LeGO из фибробластов пациентов были получены стабильные линии ИПСК с КХ 13 (четыре линии) и 22 (две линии). ИПСК культивировали на среде DMEM/F-12 с 20% KSR. В качестве фидера использовали эмбриональные фибробласты мыши, применяли механическое пассирование. Все линии демонстрировали экспрессию маркеров плюрипотентности и способность к дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Кариотип клеток устанавливали при стандартном GTG-анализе, а также с помощью метафазной и интерфазной FISH с центромерными и субтеломерными ДНК-зондами. Молекулярно-цитогенетическую характеристику полученных линий проводили с помощью гибридизации на микрочипах SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K (Agilent Technologies, США).

В обеих линиях ИПСК, полученных от пациента с r(22), клетки с КХ устойчиво сохранялись и составляли абсолютное большинство. В линии iTAF5-29 на протяжении 60 пассажей 68–97% клеток имели кариотип 46,XX,r(22), в линии iTAF5-32 клетки с кариотипом 46,XX,r(22) составляли 78–90% на протяжении 38 пассажей. Минорный класс клеток – с моносомией 22 – составлял от 5 до 26% на разных пассажах в обеих линиях. Интересно, что в обеих линиях на различных пассажах единично встречались клетки с кариотипом 46,XX, однако ожидаемого их накопления и преобладания вследствие пролиферативного преимущества в культуре ИПСК не зафиксировано. Таким образом, линии ИПСК с КХ 22 имеют относительно стабильный кариотип, а клетки

с r(22) являются модальным классом на протяжении десятков пассажей [1].

Четыре линии ИПСК с КХ 13 отличались разнообразием кариотипов. Две из них (iTAF6-6 и iTAF6-23) состояли преимущественно из клеток с кариотипом 46,XY,r(13) (65–98%) [2]. В двух других линиях (iTAF6-25 и iTAF6-36) на ранних пассажах отмечалась низкая частота клеток с r(13), преобладали клетки с кариотипами 46,XY,-13,+mar и 45,XY,-13, однако после двух десятков пассажей превалирующими также оказались субпопуляции клеток с r(13). Таким образом, примерно к 20-му пассажу наблюдалась тенденция к снижению доли моносомных (45,XY,-13) или функционально близких к моносомии кариотипов (46,XY,-13,+mar), кариотип 46,XY,r(13) становился преобладающим во всех линиях независимо от предыдущего соотношения клеточных субпопуляций. Примерно после 25 пассажей в трех из четырех линий появились клетки с трисомиями хромосом 17 и 12 – хромосомными аберрациями, часто возникающими при культивировании ИПСК [3].

Молекулярно-цитогенетическая характеристика с помощью микрочипов, проведенная для линии iTAF6-6 на 25-м пассаже, обнаружила амплификацию размером 26 Кб в регионе 13q31.3 (arr[hg19] 13q31.3(93249240_93275647)×3), затрагивающую единственный ген *GPC5* и не описанную в фибробластах, терминальную делецию 13q34 размером 2,53 Мб (arr[hg19] 13q34(112562402_115092648)×1) и трисомию по хромосоме 17. В линии iTAF6-23 на П11 идентифицирована только делеция 13q34 (arr[hg19] 13q34(113105619_115092648)×1) размером 1,987 Мб, которой соответствует область потери гетерозиготности chr13:113127471_115064542 размером 1,937 Мб. Один из наиболее интересных гибридизационных профилей хромосомы 13 был получен для линии iTAF6-25 на 12-м пассаже: множественные делеции на хромосоме 13 и область потери гетерозиготности chr13:34948188-115064542 размером 80,116 Мб. Кроме того, что удивительно, на хромосоме 13 в окружении регионов делеций выявлен участок размером 5,333 Мб с нормальной копийностью (arr[hg19] 13q14.11-q14.13(40740325_46032973)×2). Возможно, что в результате деградации кольцевой хромосомы 13 в ходе клеточных делений образовался центромеросодержащий фрагмент, в котором снова произошли терминальные амплификация и делеция, предрасполагающие к образованию нового кольца. В линии iTAF6-36 на 9-м пассаже также выявлены множественные делеции на хромосоме 13 и три области потери гетерозиготности chr13:37864292-54556304, chr13:61191960-93664425 и chr13:94437756-115064542 размером 16,692, 32,472 и 20,627 Мб соответственно. Приведенные результаты указывают на выраженную фрагментацию хромосомы 13 и на клеточную гетерогенность линий iTAF6-25 и iTAF6-36.

Таким образом, митотическая стабильность КХ в ИПСК отличается для линий с r(13) и r(22). Наблюдается разная степень динамического мозаицизма r(13) в разных линиях ИПСК, а плюрипотентное состояние совместимо с довольно широким спектром кариотипов.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Работа была выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10231.

Литература

1. *Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al.* Generation of two iPSC lines (IMGTi001-A and IMGTi001-B) from human skin fibroblasts with ring chromosome 22 // Stem Cell Res. 2018. V. 31. P. 244–248.
2. *Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al.* Induced pluripotent stem cell line, IMGTi003-A, derived from skin fibroblasts of an intellectually disabled patient with ring chromosome 13 // Stem Cell Research. 2018. V. 33. P. 260–264.
3. *Taapken S.M., Nisler B.S., Newton M.A. et al.* Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cell and embryonic stem cells // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. P. 312–313.

ГОНОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ ПРИ СИНДРОМЕ ШЕРЕШЕВСКОГО – ТЕРНЕРА

Н.В. Опарина[1], С.Г. Калиненкова[1], А.Ш. Латыпов[1], В.Б. Черных[2]

[1] Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, г. Москва

[2] Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

Синдром Шерешевского – Тернера (СШТ) является одним из наиболее частых хромосомных заболеваний, вызван полной или частичной моносомией Х и характеризуется многообразием аномалий в системе половых хромосом и высокой (в среднем 40–60%) частотой гоносомного мозаицизма (ГМ) [1–3]. Спектр и выраженность фенотипических признаков СШТ существенно варьирует и не всегда четко коррелирует с кариотипом [3]. Поскольку соотношение анеуплоидных и эуплоидных линий в разных тканях при СШТ может существенно отличаться, его диагностика затруднена, а частота ГМ недооценена.

Целью исследования являлось изучение мозаицизма по половым хромосомам и его представленности в разных тканях у пациентов с СШТ.

Материал и методы. Группу обследованных составили 36 пациенток с СШТ в возрасте от новорожденности до 57 лет. Средний возраст обследованных составил 19,3 года.

Стандартное цитогенетическое исследование выполняли на культивированных лимфоцитах периферической крови с помощью метода GTG-окрашивания. Для каждого образца анализировали от 50 до 100 метафазных пластинок. Для подтверждения

мозаицизма и детекции скрытого мозаицизма всем пациентам на лимфоцитах периферической крови проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* с центромер-специфичными ДНК-зондами для хромосом X и Y (DXZ1, DYZ3, DYZ1; Vysis, Abbott). Для выявления ГМ у 23 человек FISH-анализ проводили на дополнительной ткани – буккальном эпителии (БЭ). Гибридизацию *in situ* выполняли согласно стандартному протоколу на препаратах интерфазных ядер культивированных и некультивированных лимфоцитов периферической крови и препаратах интерфазных ядер некультивированных клеток буккального эпителия. Количество исследованных ядер для каждого образца составило от 100 до 500.

Результаты. По результатам комплексного цитогенетического обследования регулярная моносомия X (кариотип 45,X) выявлена у 9 из 36 (25%) пациентов, у остальных 27 (75%) пациентов – мозаицизм с различной представленностью анеуплоидной линии клеток в обеих исследованных тканях (таблица).

Результаты комплексного молекулярно-цитогенетического обследования пациентов с СШТ

Кариотип по данным СЦИ	Всего пациентов, абс. (%)	Исследованные ткани/клетки, число пациентов		Межтканевая вариабельность клеточных линий, число пациентов			
		Л	Л + БЭ	Л = БЭ	Л-/БЭ+	Л > БЭ	Л < БЭ
45,X	9 (25,0)	3	6	5	1 (по XX)		
46,XabnX	6 (16,7)	4	2	2			
mos45,X/46,XX	6 (16,7)	1	5	3		1 (по 45,X)	1 (по 45,X)
mos45,X/46,XY	2 (5,6)	-	2	1			1 (поY)
mos45,X/46,XabnX	8 (22,2)	2	6	3			3 (по abnX)
mos45,X/46,XabnY	2 (5,6)	1	1	1			
mos 45,X/46,XX/47,XXX	3 (8,3)	2	1			1 (по 45,X)	
Всего	36	13	23	15	1	2	5

Примечание. abn – структурная аномалия хромосом X или Y; Л – лимфоциты периферической крови; БЭ – буккальный эпителий; Л = БЭ – одинаковая представленность анеуплоидных клеточных линий в лимфоцитах и БЭ; Л-/БЭ+ – наличие дополнительной клеточной линии (указана в скобках) только в БЭ; Л > БЭ – представленность % клеточных линий (указана в скобках) в лимфоцитах выше, чем в БЭ, Л < БЭ – представленность анеуплоидных клеточных линий в лимфоцитах меньше, чем в БЭ.

У 15 из 23 (65%) пациенток отмечен схожий характер по соотношению клеточных линий в исследованных тканях, у 8 из 23 (35%) пациенток выявлена межтканевая вариабельность ГМ. Скрытый внутритканевой (только в БЭ) мозаицизм с 16% эуплоидным (XX) клоном выявлен у одной пациентки. Несовпадение по представленности (%) клеточных линий в разных тканях выявлено у 7 (19,4%) человек.

Особый интерес представляют два случая выраженного несоответствия анеуплоидной линии в лимфоцитах и БЭ. В одном случае у пациентки с фенотипом, характерным для СШТ, моносомия X с помощью стандартного цитогенетического исследования выявлена в 4% метафазных пластинок, а при FISH-анализе на некультивированных лимфоцитах – в 13% исследованных ядер. Гибридизация *in situ* выявила моносомию X в 95% клеток БЭ. Результаты повторного FISH-анализа (через три года) продемонстрировали стабильность анеуплоидии в БЭ (94% клеток с моносомией X). Во втором случае (у пациентки с мозаицизмом 45,X/46,XY) при стандартном цитогенетическом исследовании в 3% метафазных пластинок выявлен клон 46,XY. При FISH-анализе сигналы от Y-хромосомы выявлены в 5% некультивированных лимфоцитов и в 32% клеток БЭ. В обследованном семейном случае СШТ (мать и две дочери) с кольцевой X-хромосомой отмечена нестабильность и элиминация данной кольцевой хромосомы, более выраженная в лимфоцитах, чем в буккальном эпителии.

В исследованной нами выборке пациентов с синдромом Шерешевского – Тернера частота регулярной формы моносомии X составила 25%, что ниже среднего значения (40–45%) встречаемости данного цитогенетического варианта СШТ [1–3]. Мозаицизм по половым хромосомам выявлен у 75% больных, что подтверждает литературные данные, свидетельствующие о высокой частоте ГМ при данном синдроме, в том числе скрытого [2, 4, 5]. Высокая частота мозаицизма и межтканевой его вариабельности при СШТ делает такой подход целесообразным и необходимым для корректной постановки диагноза.

Литература

1. *Баранов В.С., Кузнецова Т.В.* Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб., 2007. 640 с.
2. *Вяткина С.В.* Комплексная характеристика нарушений половых хромосом у пациенток с синдромом Шерешевского – Тернера: автореферат дис. ... канд. биологических наук. СПб., 2003. 18 с.
3. *Gardner McK.R.J.M, Sutherland G.R., Shaffer L.G.* Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. Oxford University Press, 2011 (4th ed.). 634 p.
4. *Freriks K., Timmers H.J., Netea-Maier R.T. et al.* Buccal cell FISH and blood PCR-Y detect high rates of X chromosomal mosaicism and Y chromosomal derivatives in patients with Turner syndrome // Eur. J. Med. Genet. 2013. V. 56, № 9. P. 497–501.
5. *Nazarenko S.A., Timoshevsky V.A., Sukhanova N.N.* High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients // Clin. Genet. 1999. V. 56, № 1. P. 59–65.

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ МЕЖТКАНЕВОГО МОЗАИЦИЗМА ПРИ СИНДРОМЕ ДАУНА

Н.В. Опарина[1], Ю.Ю. Коталевская[1], О.А. Соловова[1], А.Ш. Латыпов[1], С.Г. Калиненкова[1], Е.Ю. Воскобоева[2]

[1] Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, г. Москва

[2] Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

Введение. Синдром Дауна (СД (OMIM 190685)) – самое известное и наиболее изученное хромосомное заболевание, частота которого составляет 1 случай на 700–800 живорожденных [1]. Встречается как в форме регулярной трисомии по хромосоме 21 (90–95% случаев), так и в мозаичном варианте (2–4% случаев) [2–7]. Так как мозаицизм может возникать на различных стадиях эмбриогенеза, то и распределение анеу-, эуплоидных линий зачастую варьирует от ткани к ткани у одного и того же пациента. Однако имеются лишь единичные описания случаев выраженной межтканевой вариабельности анеуплоидной линии при СД [5].

Представляем редкий случай низкоуровневого мозаицизма по трисомии 21 (Т21) у пациента с умственной отсталостью и комбинированным фенотипом, включающим как минимальные признаки СД, так и нетипичные для этого заболевания проявления.

Клинический случай. На консультацию к генетику обратился пациент С. (пробанд), 31 год, в сопровождении матери, для лабораторного подтверждения ранее установленного диагноза СД в связи с утерей медицинской документации. Анамнез: пробанд – второй ребенок в семье, со слов матери (без документального подтверждения); диагноз «СД, мозаичный вариант» был установлен с рождения. С раннего возраста отставал в психическом развитии, окончил три класса коррекционной школы. С 2009 г., после появления эпилептических приступов, получает противосудорожную терапию. Фенотип: рост – 160 см, масса тела – 72 кг, телосложение правильное. Лицо: высокий лоб, антимонголоидный разрез глаз, высокое нёбо. Плоский затылок, короткая шея, опущенные плечи, кифотическая осанка, укороченные конечности. Умеренная умственная отсталость с нарушениями поведения.

Материал и методы. При проведении исследования были использованы следующие методы:

– стандартное цитогенетическое исследование GTG-окрашенных метафазных (550 бэндов) хромосом из 72-часовой культуры ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови;

– молекулярно-цитогенетический анализ (флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)) с ДНК-зондом LSI 21q22(RCAN1) (Kreatech, Leica) и LSI(D21S259/D21S341/D21S342)/RB1) (Vysis, Abbott) на интерфазных ядрах некультивированных и культивированных лимфоцитов периферической крови и клеток буккального эпителия;

– анализ STR-маркеров хромосомы 21 на ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови и из культуры клеток буккального эпителия методом количественной флюоресцентной ПЦР (КФ-ПЦР);

– сравнительный анализ STR-маркеров хромосомы 21 на ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови и из культуры клеток буккального эпителия пациента и лейкоцитов периферической крови его матери.

Результаты и обсуждение. При стандартном цитогенетическом исследовании была выявлена лишь одна анеуплоидная (Т21) метафазная пластинка из 55 проанализированных. FISH-анализ подтвердил наличие анеуплоидной (Т21) линии и установил ее уровень как 1,8% в лимфоцитах периферической крови. С учетом клинической картины и полученных результатов лабораторной диагностики было проведено дополнительное исследование: FISH-анализ клеток буккального эпителия, который подтвердил наличие Т21-линии в ядрах клеток буккального эпителия на уровне 43,5%. На всех этапах проведения молекулярно-цитогенетического анализа в качестве контроля использовался сигнал от локуса RB1 на хромосоме 13.

При проведении КФ-ПЦР на ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови, анеуплоидии по хромосоме 21 не обнаружено. Известно, однако, что данный метод не позволяет выявлять случаи мозаицизма с частотой мозаичной клеточной линии менее 5%. В клетках эпителия было выявлено, что соотношение пиков STR-маркеров хромосомы 21 соответствует наличию клеток с трисомией 21 не менее чем в 40–45%.

Также был проведен сравнительный анализ STR-маркеров хромосомы 21 пациента и его матери, при котором установлено, что мозаичный вариант трисомии 21, обнаруженный в клетках эпителия пациента, не является результатом материнского мейотического нерасхождения.

Таким образом, пациенту был установлен диагноз «мозаичный вариант синдрома Дауна с выраженной межтканевой вариабельностью анеуплоидной (Т21) линии».

Как правило, диагностика СД не представляет затруднений. Любые цитогенетические варианты, включая структурные перестройки, детектируются при проведении стандартного цитогенетического исследования с использованием G-окраски. Однако в случае мозаицизма, а особенно низкоуровневого, ограничение количества просматриваемых метафазных пластинок [3] или анализ только одной ткани может привести к неправильной интерпретации результатов. Дополнительные таргетные методы, такие как интерфазный FISH-анализ и КФ-ПЦР, позволяют повысить результативность диагностики. Сравнительный анализ STR-маркеров с помощью КФ-ПЦР позволяет получить информацию о происхождении Т21, что может быть важно для дальнейшего репродуктивного прогноза семьи.

Заключение. Выявленный у пациента низкопроцентный мозаицизм (1,8% в лимфоцитах и 43,5% в буккальном эпителии) может служить объяснением

необычных фенотипических проявлений. К сожалению, нам не доступны другие ткани для изучения распределения анеуплоидного клона. Однако описанный нами случай еще раз подтверждает необходимость индивидуального подхода к каждому пациенту, расширения стандартных протоколов при несовпадении «фенотип/генотип», использования нескольких методов и нескольких тканей для исследований, тесного сотрудничества между врачом – клиническим генетиком и специалистами лабораторной диагностики для выработки оптимальной стратегии проведения обследования и ее коррекции в ходе исследования, если это необходимо.

Литература

1. *Sherman S.L., Allen E.G., Bean L.H., Freeman S.B.* Epidemiology of Down syndrome // Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2007. V. 13. P. 221–227.
2. *Papavassiliou P., Charalsawadi C., Rafferty K., Jackson-Cook C.* Mosaicism for Trisomy 21: A Review // Am. J. Med. Genet. Part A. 2015. V. 167A. P. 26–39.
3. *Hook E.B.* Exclusion of chromosomal mosaicism: Tables of 90, 95 and 99% confidence limits and comments on use // Am. J. Hum. Genet. 1977. V. 29. P. 94–97.
4. *Devlin L., Morrison P.J.* Mosaic Down's syndrome prevalence in a complete population study // Arch. Dis. Child. 2004. V. 89. P. 1177–1178.
5. *Shin M., Siffel C., Correa A.* Survival of children with mosaic Down syndrome // Am. J. Med. Genet. Part A. 2010. V. 152A. P. 800–801.
6. *Leon E., Zou Y.S., Milunsky J.M.* Mosaic Down syndrome in a patient with low-level mosaicism detected by microarray // Am. J. Med. Genet. Part A. 2010. V. 152A. P. 3154–3156.
7. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling // Oxford Monographs on Medical Genetics, 5th edition. 2018. P. 221–255.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ *ABCA1* И *ABCG1* В ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

А.А. Пантелеева[1, 2], В.В. Мирошникова[1, 2], А.В. Марков[3], М.С. Назаренко[3], И.А. Побожева[1, 2], Н.А. Разгильдина[2], О.Д. Беляева[1], Е.А. Полякова[1], О.А. Беркович[1], Е.И. Баранова[1], С.Н. Пчелина[1, 2]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург
[2] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина
[3] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Патологическое разрастание жировой ткани (ЖТ) ассоциировано с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и метаболических нарушений. Нарушение функции эпикардиальной ЖТ (ЭЖТ) вследствие ее анатомической близости к миокарду и коронарным артериям может влиять на формирование атеросклеротического поражения коронарных сосудов и развитие ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. АТФ-связывающие белки-транспортеры ABCA1 и ABCG1 играют ключевую роль в регуляции обмена холестерина в адипоцитах [2]. Влияние на экспрессию генов может оказывать метилирование ДНК. Ранее была показана ассоциация ожирения с метилированием регуляторных областей *ABCA1* и *ABCG1* в клетках крови [3].

Цель данного исследования − изучение ассоциации тканеспецифичного паттерна метилирования регуляторных областей генов транспортеров холестерина *ABCG1* и *ABCA1*, уровня их экспрессии (мРНК, белок) в ЭЖТ и подкожной жировой ткани (ПЖТ) с ИБС.

Материал и методы. Исследование было выполнено на 34 образцах ЭЖТ и 34 образцах ПЖТ, полученных в ходе операций по аортокоронарному шунтированию и замене клапана (ИБС: n = 26, контроль: n = 8). Уровень метилирования промоторной области гена *ABCA1* и областей cg06500161 и cg27243685 гена *ABCG1* определяли методом пиросеквенирования модифицированной бисульфитом ДНК. Относительный уровень мРНК генов *ABCA1* и *ABCG1* измеряли ПЦР в режиме реального времени. Уровень транспортеров ABCA1 и ABCG1 оценивался методом вестерн-блот.

Результаты. Было показано, что уровень метилирования регуляторной области гена *ABCA1* был выше в ЭЖТ (p = 0,00006) в обеих группах по сравнению с ПЖТ. В ЭЖТ уровень метилирования гена *ABCA1* был статистически значимо повышен у лиц с ИБС (p = 0,001) по сравнению с контрольной группой. Аналогичные результаты были получены для областей cg06500161 и cg27243685 гена *ABCG1* – более высокий уровень метилирования наблюдался в ЭЖТ по сравнению с ПЖТ (p = 0,00007) в обеих группах и повышенный уровень метилирования в ЭЖТ у лиц с ИБС по сравнению с контрольной группой (p = 0,004). Нами также было показано, что у лиц с осложненной ИБС уровень мРНК гена *ABCA1* в ЭЖТ и ПЖТ был статистически значимо снижен по сравнению с контрольной группой. Также снижен был и уровень белка ABCA1 в ЭЖТ (p = 0,027). Статистически значимых различий в уровнях мРНК для гена *ABCG1* обнаружено не было.

В результате проведенного исследования нами впервые были получены данные об уровне метилирования генов транспортеров холестерина *ABCA1* и *ABCG1* в ЭЖТ и ПЖТ и его влиянии на экспрессию этих генов, а также проведена оценка связи уровня метилирования данных генов с факторами риска и степенью тяжести ИБС. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что развитие ИБС ассоциировано с повышением степени метилирования регуляторных областей генов транспротеров холестерина *ABCA1* и *ABCG1* в ЭЖТ.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-00382.

Литература

1. *Nagy E., Jermendy A.L., Merkely B., Maurovich-Horvat P.* Clinical importance of epicardial adipose tissue //Arch. Med. Sci. 2017. V. 13. № 4. P. 864–874.
2. *Frisdal E., Le Lay S., Hooton H. et al.* Adipocyte ATP-binding cassette G1 promotes triglyceride storage, fat mass growth, and human obesity // Diabetes. 2015. V. 64. № 3. P. 840–855.
3. *Peng P., Wang L., Yang X. et al.* A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the *ABCG1*, *GALNT2* and *HMGCR* genes and coronary heart disease // PLoS ONE. 2014. V. 9(8). P. e102265.

ОСОБЕННОСТИ ПРЕ- И ПОСТНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА 49,XXXXY: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

С.И. Папанов, Ю.Л. Шабанова, Л.Н. Колбасин, И.А. Урванцева

Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии», медико-генетическая консультация, г. Сургут

Актуальность. Синдром 49,XXXXY – редкая хромосомная аномалия, характеризующаяся наличием трех дополнительных Х-хромосом в кариотипе у мужчин. Иногда его относят к варианту синдрома Клайнфельтера, однако более тяжелое течение и своеобразие клинической картины позволяет выделить его в самостоятельную нозологическую единицу. Признаки и симптомы синдрома 49,XXXXY включают задержку психического развития (от трудностей в обучении до тяжелой умственной отсталости), снижение мышечного тонуса, гипогонадизм, бесплодие, низкорослость, лицевые дисморфии, различные врожденные пороки развития сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата, центральной нервной системы (ЦНС), мочевыделительной системы. Обычно данное состояние не наследуется и вызывается ошибкой деления в половых клетках.

Материал и методы. Под нашим наблюдением в пренатальном периоде находилась мать ребенка, в постнатальном периоде – новорожденный доношенный мальчик Г. В процессе медико-генетического консультирования были выяснены жалобы, данные анамнеза жизни, клинико-генеалогического анамнеза с составлением родословной, проведен объективный осмотр пробанда. Пренатальное УЗИ выполнено с помощью ультразвуковой диагностической системы Voluson E10-BT 16 (General Electric Healthcare, США). Концентрации сывороточных материнских маркеров (hAFP, β-hCG, uE3) определены с помощью флуоресцентного иммунного анализа наборами Delfia Xpress (Percin Elmer, Финляндия). Расчет риска хромосомной патологии плода выполнен с помощью программного обеспечения Life Cycle (Percin Elmer, Финляндия). Цитогенетическое исследование лимфоцитов периферической крови проведено по стандартной методике, с помощью микроскопа Imager.Z2 (Carl Zeiss, Германия), с системой программного обеспечения Metasystems.

Результаты и обсуждение. Ребенок от третьей беременности (первые две беременности завершились: в 2003 г. – физиологическими срочными родами здоровой девочкой, в 2012 г. – физиологическими срочными родами здоровой девочкой); во время беременности мама ребенка встала на учет в женскую консультацию в сроке 8 недель, комбинированный пренатальный скрининг первого триместра (PAPP-A, β-hCG + УЗИ) не выполнен. В сроке беременности 19 недель назначен селективный второй биохимический скрининг (hAFP, β-hCG, uE3), выявлен повышенный риск дефектов заращения нервной трубки, риски по синдрому Дауна, синдрому Эдвардса – низкие (hAFP 2,96 MOM (115,04 U/mL), β-hCG 0,50 MOM (3,11 ng/mL), uE3 0,65 MOM (5,55 nmol/L)). Проведено медико-генетическое консультирование, экспертное УЗИ плода – выявлена варусная деформация обеих стоп. От пренатальной инвазивной диагностики пациентка отказалась. Ребенок родился от третьих срочных оперативных родов в сроке 39 недель, масса тела при рождении – 2 340 граммов, окружность головы – 33 см, оценка по шкале Апгар – 6–7 баллов. Состояние при рождении тяжелое за счет задержки внутриутробного развития, синдрома угнетения ЦНС, дыхательной недостаточности, множественных врожденных пороков развития (варусной деформации нижних конечностей, полной двусторонней расщелины твердого и мягкого неба, дефекта межпредсердной перегородки). При объективном осмотре отмечены следующие особенности фенотипа: долихоцефалическая форма черепа, выступающие лобные бугры, широкая переносица, выступающие надбровные дуги, гипертелоризм глаз, монголоидный разрез глаз, синие склеры, диспластичные, низкопосаженные ушные раковины, двусторонняя расщелина твердого и мягкого неба, шея короткая, микропенис, гипоплазия яичек, поперечная ладонная складка, варусная деформация нижних конечностей. На основании наличия множественных малых аномалий развития заподозрена хромосомная патология, выполнено цитогенетическое исследование лимфоцитов крови, кариотип: 49,XXXXY – тетрасомия хромосомы Х, кариотип мужской.

Заключение. Приведенный случай редкой хромосомной патологии у ребенка Г. свидетельствует о значимости проведения мероприятий мониторирования состояния плода в первом и втором триместрах беременности, важности медико-генетического консультирования на пренатальном этапе и проведения инвазивной пренатальной диагностики в регламентированные сроки с целью своевременного рассмотрения вопроса о тактике ведения беременности.

Настоящее наблюдение представляет большой интерес с клинической и диагностической точки зрения, поскольку крайне редко встречается в повседневной практике.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ЭМБРИОНА ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

В.П. Пушкарев, Е.А. Глазырина, Т.Е. Серебреникова

Медико-генетический центр «Проген», г. Москва

Примерно 10–15% всех беременностей заканчиваются самопроизвольным абортом. Установлено, что более 50% спонтанных прерываний беременности обусловлено хромосомными аномалиями плода (из них около 90% – численными аномалиями хромосом, 6% – структурными аномалиями, остальное – мутациями в одном гене и мозаицизмом) [1]. Другими причинами регресса беременности являются инфекции, тромбофилия, материнский гормональный дисбаланс, пороки развития матки, иммунологические нарушения.

В лабораторию медико-генетического центра «Проген» обратилась женщина 1986 года рождения с неразвивающейся беременностью. Акушерско-гинекологический анамнез отягощен бесплодием в течение 10 лет и двумя неудачными попытками ЭКО (первая – анэмбриония после криопереноса, вторая – отсутствие имплантации). Данная беременность наступила естественным путем. На сроке 11 недель был проведен неинвазивный пренатальный тест (НИПТ) Veracity (NIPD Genetics, Республика Кипр), который показал очень низкий риск для плода по трисомиям хромосом 21, 18, 13, анеуплоидиям половых хромосом и микроделеционных синдромов – Ди Джорджи (22q11), 1p36, Смит – Магенис (17p11.2), Вольфа – Хиршхорна (4p16.3). Уровень фетальной фракции – 6,1%. НИПТ показал отсутствие у плода Y-хромосомы. Регресс беременности наступил на 12-й неделе.

Стандартное цитогенетическое исследование ворсин хориона, проведенное в медико-генетической консультации по месту жительства, выявило кариотип:

mos 92,XXXY[1]/69,XXY[3]/46,XX[8]/46,XY[4].

Был поставлен диагноз «мозаицизм, сочетающий в себе триплоидию, тетраплоидию и нормальный кариотип, что явилось причиной регресса данной беременности».

В лабораторию медико-генетического центра «Проген» поступил хорион и кровь пациентки. Из крови женщины и двух разных участков хориона были выделены образцы ДНК с помощью органической экстракции. Концентрацию ДНК измерили на спектрофотометре DS-11+ (DeNovix, США). Для проверки происхождения хориона, наличия триплоидии и примеси материнской ДНК использовали набор реагентов для мультиплексного анализа 19 STR-маркеров и локуса амелогенина человека COrDIS Expert («Гордиз», Россия). Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью генетического анализатора (ThermoFisher, США). Генетические профили двух образцов ДНК из хориона были идентичны, без признаков примеси постороннего генетического материала, по всем 19 аутосомным локусам содержали аллели, которые присутствовали в генотипе пациентки. Вероятность материнства составила 99,99999%. На электрофореграммах образцов ДНК хориона отсутствовал дисбаланс высот пиков аллелей, который бы свидетельствовал о три- или анеуплоидии. Локус амелогенин был представлен одним пиком, соответствующим X-хромосоме.

Для более детального исследования статуса половых хромосом в хорионе была проведена количественная флуоресцентная ПЦР (КФ-ПЦР), которая включала одновременную амплификацию 10 маркеров: амелогенин (Yp11.2 и Xp22.2), X/Y (Yp11.2 и Xp22.2), X/3 (Xq21.1 и 3p24.2), X/16 (Xp11.3 и 16q22.1), Y/1 (Yq11.23 и 1q32.1), SRY (Yp11.2), DYS437 (Yq11.21), DXS6809 (Xq21.33), DXS8377 (Xq28), D19S253 (19p13.12). Для фрагментного анализа использовали программу GeneMapper v5 (ThermoFisher, США). Ни по одному из пяти маркеров, локализованных на хромосоме Y, не было получено целевых ПЦР-продуктов. Оба микросателлита на хромосоме X были информативными (в гетерозиготном состоянии), отношение высот их пиков было 1 : 1. Отношение высот пиков гомологичных регионов на хромосоме X и хромосоме 3, так же как и на хромосоме X и хромосоме 16, было 1 : 1. Кроме того, микросателлит D19S253 на хромосоме 19 был в гетерозиготном состоянии и отношение высот пиков было 1 : 1. Таким образом, КФ-ПЦР показала отсутствие целевых продуктов Y-хромосомы, отсутствие признаков анеуплоидии по хромосомам X и 19.

Для выявления возможных хромосомных нарушений в хорионе была проведена сравнительная геномная гибридизация (aCGH) на чипе GenetiSurePre-Screen Array 8×60K (Agilent, США). Чип сканировали с помощью сканера SureScan Microarray Scaner Agilent G2600D (Agilent, США) и анализировали с помощью программы CytoGenomics v3.0 (Agilent, США). Хромосомные нарушения в хорионе не были выявлены, молекулярный кариотип: arr [hg19] (1-22)×2, (X)×2.

Таким образом, результаты NGS-секвенирования таргетных регионов фетальной ДНК и комбинированные молекулярно-генетические методы анализа хориона не подтвердили заключение, выданное после цитогенетического исследования хориона.

Результаты стандартного цитогенетического анализа материала спонтанных абортусов зависят от успешного культивирования клеток. В среднем частота невозможности анализа кариотипа эмбриона при неразвивающейся беременности составляет 25% [2]. Именно с этим может быть связано разногласие между результатами НИПТ, цитогенетического исследования, КФ-ПЦР и aCGH.

Выводы. Для надежного и наиболее полного установления генетических причин неразвивающейся беременности необходимо комплексное использование современных молекулярно-генетических методов, таких как aCGH и КФ-ПЦР [3]. Анализ кариотипа рекомендуется проводить супругам, планирующим беременность, для исключения носительства

сбалансированных хромосомных перестроек (транслокаций, инверсий), особенно тем семейным парам с невынашиванием, при генетическом исследовании абортивного материала которых выявлено подозрение на такое носительство. Выявление причины неразвивающейся беременности может значительно снизить психологический стресс у женщин, а также улучшить качество медико-генетического консультирования семейной пары и оптимизировать прогноз для будущего потомства.

Литература

1. *Никитина Т.В., Лебедев И.Н.* Цитогенетика привычного невынашивания беременности // Генетика. 2014. Т. 50, № 5. С. 501–514.
2. *Baxter L., Adayapalam N.* A comparative study of standard cytogenetic evaluation and molecular karyotyping for products of conception // Diagn. Mol. Pathol. 2013. № 4. P. 228–235.
3. *Kubendran S., Duong J., Dong F. et al.* Implementing a protocol to optimize detection of chromosome abnormalities in cases of miscarriage or stillbirth at a Midwestern teaching hospital // Perm. J. 2018. V. 22. P. 17–204.

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ *ADAMTS1, THBS1* И *RBFOX2* НА ЧАСТОТУ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ И РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОТВЕТ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Р.Р. Савченко[1], С.А. Васильев[1], В.С. Фишман[2], А.А. Мурашкина[3], И.Н. Лебедев[1]

[1] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск*
[2] *Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск*
[3] *Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск*

На сегодняшний день не существует надежных систем для прогноза индивидуальной радиочувствительности здоровых и опухолевых соматических клеток человека, однако проведение исследований в данном направлении, установление генов, определяющих явление индивидуальной радиочувствительности, представляются актуальными и могут открыть новые перспективы в терапии онкологических заболеваний. Эксперименты, проведенные нами ранее на лимфоцитах периферической крови человека, позволили выявить связь дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* со спонтанным уровнем фокусов γH2AX и 53BP1, являющихся маркерами процессов репарации, и частотой радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер, отражающих уровень повреждения ДНК. Продукты генов *ADAMTS1* и *THBS1* локализуются в межклеточном матриксе и участвуют в реализации различных сигнальных путей, таких как TGFβ, VEGF и NO-сигнальный путь. Продукт гена *RBFOX2* кодирует РНК-связывающий белок, участвующий в регуляции альтернативного сплайсинга. Для оценки возможности участия продуктов данных генов в формировании радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК на основании опухолевой линии HeLa с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 были созданы модельные системы, представляющие собой линии с нокаутом изучаемых генов. В нокаутных клеточных линиях были проведены: оценка эффективности посева и клональной выживаемости после воздействия ионизирующего γ-излучения, оценка уровня спонтанных фокусов γH2AX и 53BP1, а также анализ частоты радиационно-индуцированных микроядер. Кроме того, во всех клеточных линиях с помощью экспрессионных микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K (Agilent Technologies, США) был проведен анализ транскрипционного профиля до облучения и после воздействия γ-излучения в дозе 2 Гр.

Эффективность посева до облучения в клеточной линии с нокаутом гена *THBS1* была снижена в 1,4 раза (p = 0,0002) по сравнению с интактной линией HeLa. Для линий с нокаутом генов *ADAMTS1* и *RBFOX2* было показано снижение клональной выживаемости после облучения в дозе 2 Гр в 1,9 (p = 0,014) и 1,8 раза (p = 0,017) соответственно. Таким образом, нокаут данных генов по-разному влияет на выживаемость и способность к формированию колоний необлученных и облученных клеток. Нокаут изучаемых генов не приводил к изменению уровня спонтанных фокусов γH2AX и 53BP1, однако во всех созданных линиях наблюдалось повышение частоты микроядер после облучения: в 2,3 раза (p = 0,005) при нокауте *ADAMTS1*, в 2,5 раза (p = 0,01) при нокауте *THBS1* и в 2 раза (p = 0,05) при нокауте *RBFOX2.*

Полнотранскриптомный анализ позволил выявить большое число дифференциально экспрессирующихся генов. Среди генов с пониженной экспрессией особенный интерес представляют *SPTBN1* и *PRKDC.* Ген *SPTBN1* кодирует белок спектрин, являющийся ключевым адаптером и транскрипционным кофактором, регулирующим сигнальный путь TGF-β. Известно, что дефицит спектрина приводит к повышению чувствительности к репликационному стрессу [1]. Экспрессия *SPTBN1* была снижена во всех нокаутных линиях. Ген *PRKDC* кодирует каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы – фермента, играющего ключевую роль в процессах репарации двунитевых разрывов ДНК и регуляции клеточной радиочувствительности. Нокдаун гена *PRKDC* приводит к нарушению функции ДНК-зависимой протеинкиназы и фенотипу, характерному для клеточного старения после облучения опухолевых клеток человека [2]. В другом исследовании мутации гена *PRKDC* были обнаружены у пациентов с нарушениями репарации двухцепочечных разрывов ДНК [3]. Пониженная экспрессия *PRKDC* наблюдалась нами при нокауте гена *THBS1.* Кроме того, нокаут гена *RBFOX2* приводил к снижению экспрессии генов *JUN*, *FOS*, *FOSB* и *ATF3*. Продукты данных генов являются транскрипционными факторами, повышенная экспрессия которых запускает экспрессию генов репарации ДНК [4, 5]. Возможно, снижение экспрессии описанных выше генов в нокаутных клеточных линиях после облучения могло

приводить к нарушению процессов репарации разрывов ДНК и, как следствие, к повышению частоты радиационно-индуцированных микроядер и снижению клональной выживаемости.

Среди генов с повышенной экспрессией следует отметить *SEPP1* (при нокауте *ADAMTS1* и *THBS1*), *HIF3A* (при нокауте *THBS1*) и *GAPLINC* (при нокауте *ADAMTS1*). Ген *SEPP1* кодирует селенопротеин; данный белок рассматривается в качестве антиоксиданта, активирующегося в ответ на воздействие радиации. Было показано, что нокдаун *SEPP1* приводит к окислительному стрессу и снижению жизнеспособности миофибробластов, в то время как сверхэкспрессия данного гена способствовала снижению уровня поздних активных форм кислорода [6]. Ген *HIF3A* кодирует субъединицу одного из транскрипционных факторов семейства HIF. Транскрипционный фактор HIF-1α активирует кодируемую геном *GAPLINC* РНК, что способствует опухолевой миграции и инвазивному поведению. Кроме того, сверхэкспрессия *GAPLINC* ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с аденокарциномой желудка [7].

Таким образом, нокаут генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* приводит к повышению частоты радиационно-индуцированных микроядер и в случае нокаута генов *ADAMTS1* и *RBFOX2* снижает выживаемость клеток после облучения. Возможно, наблюдаемые явления объясняются снижением в нокаутных клеточных линиях экспрессии генов, продукты которых вовлечены в процессы репарации двунитевых разрывов ДНК.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Исследование выполнено при поддержке гранта президента РФ № МК-5944.2018.4 и гранта РФФИ № 19-34-90143.

Литература

1. *Horikoshi N., Pandita R.K., Mujoo K. et al.* β2-spectrin depletion impairs DNA damage repair // Oncotarget. 2016. V. 7, № 23. P. 33557–33570.
2. *Azad A., Jackson S., Cullinane C. et al.* Inhibition of DNA-dependent protein kinase induces accelerated senescence in irradiated human cancer cells // Mol. Cancer Res. 2011. V. 9, № 12. P. 1696–1707.
3. *Mathieu A.L., Verronese E., Rice G.I. et al. PRKDC* mutations associated with immunodeficiency, granuloma, and autoimmune regulator-dependent autoimmunity // J. Allergy Clin. Immunol. 2015. V. 135, № 6. P. 1578–1588.
4. *MacLaren A., Black E.J., Clark W., Gillespie D.A.* c-Jun-deficient cells undergo premature senescence as a result of spontaneous DNA damage accumulation // Mol. Cell. Biol. 2004. V. 24, № 20. P. 9006–9018.
5. *Christmann M., Kaina B.* Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. № 18. P. 8403–8420.
6. *Eckers J.C.* SEPP1 and FoxM1 regulate oxidative stress-mediated radiation response. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Iowa, 2013.
7. *Liu L., Zhao X., Zou H. et al.* Hypoxia promotes gastric cancer malignancy partly through the HIF-1α dependent transcriptional activation of the long non-coding RNA GAPLINC // Front. Physiol. 2016. V. 7. P. 420.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ ПРИ НАРУШЕНИЯХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Е.А. Саженова, И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Некоторая часть генома млекопитающих и человека подвергается импринтингу – явлению функциональной неэквивалентности аллелей, активность которых зависит от их родительского происхождения. Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития и может оказывать влияние на степень экспрессии генов, контролирующих рост эмбриона, процессы пролиферации и дифференцировки клеток и другие процессы внутриутробного развития плода [1]. Для человека как биологического вида характерна высокая частота репродуктивных потерь: 15–20% клинически распознаваемых беременностей заканчиваются спонтанными абортами (СА), а 2–3% женщин имеют привычное невынашивание беременности (ПНБ), характеризующееся наличием трех и более СА. Половина ранних репродуктивных потерь сопровождается аномалиями кариотипа, а причина остановки остальной части зародышей с нормальным кариотипом до сих пор не определена [2]. В то же время определенной селективной значимостью могут обладать аберрантные эпигенетические модификации генома, частота которых, по предварительным оценкам, на один-два порядка превышает среднюю частоту генных мутаций. Таким образом, исследование эпигенетических нарушений на модели импринтированных генов расширяет возможности молекулярно-генетического анализа различных по своей функциональной значимости эпимутаций. Поэтому **целью настоящего исследования** стало определение структуры эпигенетической вариабельности генома на модели импринтированных генов при патологии эмбрионального развития человека.

В данном исследовании в плацентарных тканях СА первого триместра беременности от женщин с ПНБ или со спорадической потерей беременности проведен анализ дифференциального метилирования 47 импринтированных генов. Показано, что у абортусов от женщин с ПНБ в отличие от эмбрионов от женщин со спорадической потерей беременности статистически значимо чаще регистрируются эпимутации импринтированных генов – 6,2 и 3,7% на локус соответственно (p < 0,01). Преобладающим типом эпимутаций оказалось постзиготическое

гипометилирование импринтированных генов на хромосомах материнского происхождения, составившее в исследованных группах 5,1 и 2,9% на локус соответственно. Репликативное исследование статуса метилирования восьми импринтированных генов (*DLK1, PEG10, PLAGL1, KCNQ1OT1, PEG3, GRB10 и PEG1/MEST*) в дополнительных выборках эмбрионов подтвердило результаты микрочипового анализа как в отношении частот эпимутаций, так и в отношении преобладания соматического гипометилирования аллелей материнского происхождения. Таким образом, впервые установлено, что остановка эмбрионального развития организма сопровождается мультилокусными дефектами метилирования импринтированных генов, частота которых повышена в плацентарных тканях СА от женщин с ПНБ.

Наличие множественных эпимутаций свидетельствует в пользу того, что, возможно, в основе этих процессов лежат мутации в генах, осуществляющих контроль за импринтингом у человека, а супружеские пары с привычным невынашиванием беременности являются носителями мутаций в этих генах, которые у эмбриона формируют множественные эпимутации в импринтированных генах и тем самым останавливают его развитие. В пользу данной гипотезы имеются данные о генах, ассоциированных с возникновением эпимутаций в импринтированных генах – *NLRP7 (NALP7)*, *NLRP2*, *ZFP57*, *PADI6*, *C6Orf221*. Так, мутации в генах *NLRP7* и *C6Orf221* обнаружены при семейных и повторяющихся формах бородительского полного пузырного заноса, сопровождающегося глобальным нарушением установления метилирования импринтированных генов в оогенезе [3]. Гипометилирование множества импринтированных локусов описано и у пациентов с транзиторным неонатальным сахарным диабетом, имеющих мутации в гене транскрипционного фактора *ZFP57* [4]. В отношении ПНБ (не сопровождающегося полным пузырным заносом) в литературе не обнаружено данных об оценке распространенности мутаций в отмеченных генах. Поэтому нами был проведен поиск нуклеотидных замен в генах *ZFP57* (6p22.1) и *NLRP7* (19p13) у 36 СА с множественными эпимутациями в импринтированных локусах от женщин с ПНБ и без него, как еще одной из возможных причин формирования множественного нарушения метилирования импринтированных генов при остановке эмбрионального развития.

У 14% СА с нарушениями статуса метилирования в двух и более импринтированных локусах выявлены нуклеотидные замены в гене *ZFP57* в гетерозиготном состоянии. Нуклеотидные замены представлены тремя миссенс-мутациями (c.1117T>G p.Gln235Pro, c.1660T>G p.Leu416Phe и c.1710A>C p.Leu433Arg (rs759846876)). Ни одного случая замен в гомо- или в компаундном гетерозиготном состоянии не обнаружено.

Мутации в гене *NLRP7* выявлены у восьми СА. Большинство мутаций представлено миссенс-мутациями в экзонах 5, 6 и 9, приводящими к замене одной аминокислоты на другую. Три замены описаны ранее в виде полиморфизмов, встречающихся в популяции. Кроме того, у двух СА выявлены однонуклеотидные делеции в 8-м или 9-м экзонах, а у третьего – однонуклеотидная инсерция в 9-м экзоне, приводящая во всех случаях к сдвигу рамки считывания. В одном случае обнаружена делеция в интроне 2. Все СА с мутациями в гене *NLRP7* имеют эпимутации как минимум в трех импринтированных генах, представленных не только их гипо-, но и гиперметилированием. Не выявлено ни одного случая мутаций у СА одновременно в двух генах – *NLRP7* и *ZFP57.*

У трех из восьми СА с мутациями в гене NLRP7 был проведен анализ родительского происхождения мутаций. Во всех случаях показано носительство у обоих супругов мутаций гена *NLRP7* в гетерозиготном состоянии, наследование которых в компаундном гетерозиготном состоянии может привести к остановке эмбрионального развития. Впервые идентифицированные мутации *NLRP7* были унаследованы от отцов, в то время как все известные полиморфные варианты имели материнское происхождение. Кроме того, у трех СА с мутациями NLRP7 отцовского происхождения впервые обнаружено герминативное гиперметилирование отцовских аллелей импринтированного гена *PEG1*. Полученные данные свидетельствуют о том, что генетические нарушения *NLRP7* не только в оогенезе, но и при сперматогенезе, могут быть ассоциированы с установлением аномального эпигенетического статуса импринтированных генов, приводящего в дальнейшем к остановке эмбрионального развития.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Tucci V., Isles A.R., Kelsey G. et al.* Genomic imprinting and physiological processes in Mammals // Cell. 2019. V. 176, № 5. P. 952–965.
2. *Bastos R., Ramalho C., Dória S.* Prevalence of chromosomal abnormalities in spontaneous abortions or fetal deaths // Acta Med. Port. 2014. V. 27, № 1. P. 42–48.
3. *Andreasen L., Christiansen O.B., Niemann I. et al. NLRP7* or *KHDC3L* genes and the etiology of molar pregnancies and recurrent miscarriage // Mol. Hum. Reprod. 2013. V. 19, № 11. P. 773–781.
4. *Touati A., Errea-Dorronsoro J., Nouri S. et al.* Transient neonatal diabetes mellitus and hypomethylation at additional imprinted loci: novel *ZFP57* mutation and review on the literature // Acta Diabetol. 2019. V. 56, № 3. P. 301–307.

ДИАГНОСТИКА ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Р.Р. Салахов[1, 2], А.А. Зарубин[1], Е.Н. Павлюкова[3], А.Ф. Канев[3], О.С. Глотов[4], Д.А. Алавердян[4], М.С. Назаренко[1, 2], М.В. Голубенко[1], В.П. Пузырёв[1, 2]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск
[3] Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[4] Городская больница № 40, г. Санкт-Петербург

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является наиболее распространенным наследственным сердечно-сосудистым заболеванием, характеризующимся идиопатической асимметричной гипертрофией миокарда, интерстициальным фиброзом, высоким риском внезапной смерти. В последнее время в генодиагностике находит широкое применение массовое параллельное секвенирование, или «секвенирование следующего поколения» (NGS), которое позволяет по-новому взглянуть на диагностику различных заболеваний, в том числе ГКМП, и обеспечить основу для практического применения генетического тестирования. Среди генов, связанных с развитием ГКМП, главным образом выделяют *MYBPC3* и *MYH7*, однако общее число генов ГКМП может достигать нескольких десятков. Мы провели поиск генетических вариантов, ассоциированных с развитием ГКМП, с помощью NGS у 12 пациентов с клиническим диагнозом ГКМП. Все пациенты были обследованы и диагностированы в НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Для анализа использовали NGS-панель TruSight Cardiomyopathy (Illumina, США), в которую входят 46 генов наследственных кардиомиопатий. ДНК-библиотеки были приготовлены в соответствии с протоколом целевого обогащения и просеквенированы на приборе MiSeq (Illumina, США) с длиной прочтения 2 x 150. В результате анализа полученных данных нами были выбраны девять потенциально патогенных вариантов, выявленных у восьми пациентов из 12 (таблица). Согласно рекомендациям по интерпретации данных MPS [1], шесть из этих вариантов были классифицированы как патогенные и вероятно патогенные, а три – как варианты неизвестного значения. Обе мутации в самом частом гене ГКМП (*MYH7*) были локализованы в конвертерном домене белка: известно, что мутации в этом домене характеризуются неблагоприятным прогнозом [2]. Одна пациентка имела два потенциально значимых варианта: в гене тропонина T (ранее описанная мутация) и в гене десмоколлина-2 (*DSC2*), известного как ген аритмогенной дисплазии правого желудочка (ARVD) [3] (вариант неопределенного значения). Интересно, что еще у одного больного была выявлена мутация в гене аритмогенной дисплазии правого желудочка – в *PKP2* (плакофилин-2), хотя фенотип соответствовал гипертрофической кардиомиопатии. Подобные случаи описаны в литературе [4]. Еще один вероятно патогенный вариант был выявлен в гене *LAMP2*, мутации которого приводят к болезни Данона (накопление гликогена в лизосомах), которая проявляется в том числе и гипертрофической кардиомиопатией [5].

Оценка функциональной значимости генетических вариантов, выявленных у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией

№	Ген	Амино-кислотная замена	Программы оценки патогенности					Популяционная частота		Оценка патогенности варианта [1]
			1	2	3	4	5	1000g	gnomAD	
1	*TNNT2*	p.R278C	Вероятно патогенный	T	T	M	A	0	$4{,}0 \cdot 10^{-4}$	Патогенный
2	*ACTN2*	p.A166V	Возможно патогенный	D	T	M	D	0	0	Неопределенного значения
3	*MYBPC3*	p.A774T	Нейтральный	D	T	M	N	0	$6{,}8 \cdot 10^{-6}$	Неопределенного значения
4	*PKP2*	p.Q181X	–	–	–	–	A	0	0	Патогенный
5	*MYH7*	p.R719Q	Нейтральный	D	D	L	A	0	0	Патогенный
6	*MYH7*	p.L714R	Нейтральный	D	D	L	D	0	0	Патогенный
7	*DSC2*	p.E896fs	–	–	–	–	-	$3{,}6 \cdot 10^{-3}$	$8{,}4 \cdot 10^{-3}$	Неопределенного значения
8	*MYOZ2*	p.I246M	Нейтральный	D	T	L	D	0	0	Вероятно патогенный
9	*LAMP2*	p.V64fs	–	–	–	–	–	0	0	Вероятно патогенный

Примечание. «–» – нет данных. Программы оценки патогенности: 1 – Polyphen2_HVAR; 2 – SIFT, 3 – FATHMM (D – вредная (deleterious), T – толерантная (tolerated)); 4 – MutationTaster (M – функциональная (functional), L – нефункциональная (non-functional)); 5 – MutationAssessor (A – связанная с заболеванием по умолчанию (disease causing «automatic»), D – связанная с заболеванием (disease causing); N – нейтральная (neutral)). Популяционная частота приведена для европеоидов из базы данных проекта «1000 геномов» и базы gnomAD.

Полученные результаты подчеркивают генетическую гетерогенность ГКМП и необходимость проведения молекулярно-генетического обследования пациента.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др.* Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // Мед. генетика. 2017. Т. 16, № 7. С. 4–17.
2. *García-Giustiniani D., Arad M., Ortíz-Genga M. et al.* Phenotype and prognostic correlations of the converter region mutations affecting the β myosin heavy chain // Heart. 2015. V. 101. P. 1047–1053.
3. *Syrris P., Ward D., Evans A. et al.* Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2 // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 79, № 5. P. 978–984.
4. *Bainbridge M.N., Li L., Tan Y. et al.* Identification of established arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy mutation in a patient with the contrasting phenotype of hypertrophic cardiomyopathy // BMC Med. Genet. 2017. V. 18 (1). P. 24.
5. *Вайханская Т.Г., Сивицкая Л.Н., Даниленко Н.Г. и др.* Болезнь Данона: редко выявляемое системное заболевание с LAMP2-кардиомиопатией // Российский кардиологический журнал. 2017. № 10. С. 93–99.

РЕГИОНЫ ГОМОЗИГОТНОСТИ В ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ СПОНТАННЫХ АБОРТУСОВ

Н.А. Скрябин, С.А. Васильев, Т.В. Никитина, Д.И. Жигалина, Р.Р. Савченко, Н.П. Бабушкина, М.Е. Лопаткина, А.А. Кашеварова, И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – это самопроизвольное прерывание беременности два и более раз подряд. Частота привычного невынашивания беременности составляет около 2% от общего числа беременностей. Одной из основных причин спонтанных прерываний беременности являются числовые хромосомные аномалии. Тем не менее этиологические факторы у 40% абортусов от женщин с ПНБ остаются невыясненными [1, 2]. В настоящей работе проведено исследование протяженных гомозиготных районов (Runs of Homozygosity (ROH)) в геноме как возможного этиологического фактора в развитии привычного невынашивания беременности.

Всего проанализировано 22 парных абортуса первого триместра беременности от 11 женщин с привычным невынашиванием беременности. У всех абортусов был нормальный кариотип по результатам метафазного кариотипирования и сравнительной геномной гибридизации на метафазных пластинках. В работе были использованы микрочипы SurePrint G3 Human CGH + SNP4 × 180K (Agilent Technologies). Результаты визуализированы с использованием программы Cytogenomics (Agilent Technologies). Повторяющиеся гомозиготные участки были верифицированы с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Всего было идентифицировано 39 областей с ROH в экстраэмбриональных тканях 15 абортусов. Средний размер гомозиготных регионов составил 4,6 м.п.о. (от 2 до 9,6 м.п.о.). Шотландскими исследователями было показано, что в изолированных популяциях частота длинных ROH регистрировалась чаще (~80%), чем в урбанизированных популяциях (~20%) [3]. В нашей выборке частота длинных ROH составила 68% (15 из 22), что может указывать на роль инбридинга в этиологии привычного невынашивания беременности. Кроме того, у двух абортусов из одной семьи были выявлены идентичные регионы ROH (1q41-q42.13 и 7q21.11-q21.13), а в другой семье у обоих абортусов был идентифицирован ROH в регионе 11p12. Также были обнаружены два участка с ROH (7q21.11-q21.13 и 10q21.1), каждый из которых был выявлен у двух эмбрионов из разных семей, и один участок (18q12.1-q12.2) обнаружен у трех абортусов из разных семей.

Для 25 протяженных ROH было показано наличие единичных гетерозиготных SNP, что может являться свидетельством наследования данных гомозиготных регионов. В ходе наследования в ряду поколений в таких регионах могут накапливаться мутации, приводящие к гетерозиготизации изначально гомозиготных участков генома. Одним из возможных механизмов реализации патогенного фенотипа в данном случае может являться гомозиготизация рецессивных мутаций. Также в 14 регионах с ROH были выявлены только гомозиготные SNP, что может являться результатом *de novo* мутационных событий, например однородительской дисомии. В таком случае механизмом, ответственным за патологическое проявление гомозиготных районов в эмбриогенезе, могут быть аномалии геномного импринтинга. В составе обнаруженных регионов гомозиготности в соответствии с базой данных Geneimprint было выявлено пять предположительно импринтированных генов: *OBSCN*, *HIST3H2BB*, *LMX1B*, *CELF4* и *FAM59A*.

В результате выполнения настоящей работы впервые была показана высокая частота длинных ROH в тканях спонтанных абортусов с нормальным кариотипом из семей с привычным невынашиванием беременности.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Robberecht C., Pexsters A., Deprest J. et al.* Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss // Prenat. Diagn. 2012. V. 32 (10). P. 933–942.
2. *Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Tolmacheva E.N. et al.* Comparative cytogenetic analysis of spontaneous abortions in recurrent and sporadic pregnancy losses // Biomed. Hub. 2016. V. 1. P. 446099.
3. *McQuillan R., Leutenegger A.L., Abdel-Rahman R. et al.* Runs of homozygosity in European populations // Am. J. Hum. Genet. 2008. V. 83 (3). P. 359–372.

ХРОМОСОМНЫЕ МИКРОДУПЛИКАЦИИ С НЕОПРЕДЕЛЕННОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

А.А. Слепухина[1, 2], М.А. Новикова[3], М.Е. Лопаткина[1], А.В. Зубрицкий[3], Г.И. Лифшиц[2], И.Н. Лебедев[1]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
[3] Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск

В ходе обследования 44 детей с врожденными пороками сердца (ВПС) и экстракардиальной патологией с помощью ДНК-микрочипов высокого разрешения SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 8×60K (Agilent Technologies, США) у 18% пациентов были выявлены хромосомные микродупликации с неопределенной клинической значимостью. Согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики вариации числа копий ДНК (copy number variation, CNV) с неопределенной клинической значимостью подразделяют на вероятно полиморфные, потенциально патогенные и собственно с неустановленной клинической значимостью. Оценка клинической значимости производится с учетом клинической картины, уникальности, размера, генного состава, происхождения CNV [1]. Дополнительным источником трудностей в интерпретации является вариабельная экспрессивность и неполная пенетрантность CNV. С целью раскрытия подходов и тенденций в интерпретации клинической значимости, а также разрешения возникающей неоднозначности подробно представлена информация о четырех микродупликациях, выявленных у детей с ВПС в нашем исследовании. Микродупликация arr[hg19] chr13q14.11(43544758_43731917)×3, обнаруженная у мальчика с дефектом межжелудочковой перегородки и открытым овальным окном, имела размер 187,16 kb и включала два белок-кодирующих гена – *EPSTI1*, *DNAJD2*. Ген *EPSTI1* отвечает за эпителиально-стромальное клеточное взаимодействие, изучается в контексте инвазии и метастазирования при раке молочной железы [2]. Ген *DNAJD2* влияет на функционирование митохондрий, относится к белкам теплового шока, практически не исследован у людей. Ортологи *DNAJD2* влияют на формирование пронефроса у *Xenopus* [3], на эмбриональное развитие у быков, нарушение функции приводит к недоразвитию эмбрионов и повышенной эмбриолетальности [4].

Согласно DGV (http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home), CNV, наиболее приближенная по размеру к описываемой нами микродупликации, встречается у здорового населения с частотой 0,06%. В DECIPHER (https://decipher.sanger.ac.uk) указаны: одна идентичная микродупликация с неизвестным клиническим значением и четыре микродупликации с иными точками разрывов, но с тем же генным составом, которые отнесены ко всем трем вышеупомянутым типам CNV неопределенной клинической значимости; ВПС в описании фенотипических данных у этих пациентов отсутствуют. В ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) у пяти других пациентов с микродупликациями хромосомы 13, содержащими два указанных гена, CNV отнесены к группам потенциально доброкачественных (запись 2010, 2011 гг.) и неизвестного значения (2018 г.). У одного пациента был зарегистрирован дефект межжелудочковой перегородки и внутриутробная задержка роста, у двух пациентов имелась интеллектуальная недостаточность и множественные врожденные пороки развития, еще двум пациентам был поставлен диагноз «аутизм».

По литературным данным, у пациентов с ВПС описаны два случая микродупликаций хромосомы 13 большей протяженности. В первом случае у одного из 443 обследованных пациентов с тетрадой Фалло обнаружена микродупликация размером 555 kb (содержащая четыре гена – *FAM216B*, *EPSTI1*, *DNAJD2* и *TNFSF11*, последний из указанных выделен в качестве кандидатного), которая не встречалась в контрольной выборке численностью 2 774 человека [5]. Во втором случае у одного из 150 детей с несиндромальными ВПС выявлена микродупликация размером 1 430 kb, включающая гены *TNFSF11*, *FAM216B*, *EPSTI1*, *DNAJD2*, *ENOX1*, *CDC122*, *C13orf31C* [6]. Обе CNV возникли *de novo*. Учитывая случаи ВПС у других пациентов с похожими микродупликациями, вовлеченность продуктов гена данного региона в регуляцию клеточной миграции и эмбриогенеза у животных, нельзя исключить вероятность патогенности данной микродупликации. Поэтому CNV, выявленная в нашем исследовании, была отнесена к группе с неустановленной клинической значимостью. Микродупликацию arr[hg19] chr16p11.2p11.1(32624578_34777244)×3 у девочки с дефектом межжелудочковой перегородки отличает крупный размер (2 152,67 kb) и уникальность (в таком виде она не зарегистрирована в DGV). Данная CNV содержит 35 генов, большинство из которых не охарактеризованы, два гена кодируют белки – мишени для TP53 с неизвестной функцией. В ClinVar приведены CNV, которые пересекаются

с данной микродупликацией не более чем на 50%, и отнесены преимущественно к полиморфным. В DECIPHER приводится информация о шести сходных по размеру микродупликациях, классифицированных как CNV неясного клинического значения, которые описаны у пациентов с аутизмом, поведенческими проблемами, задержкой речевого развития, эпикантом, высоким небом, умственной отсталостью. Ни у одного пациента из упомянутых выше баз данных не было диагностировано пороков сердца. Лишь в одном исследовании при обследовании 78 детей с ВПС была выявлена микроделеция меньшей протяженности [7], полностью входящая в регион обнаруженной нами микродупликации. Таким образом, для данной микродупликации на настоящее время недостаточно сведений для вынесения вердикта о ее клинической значимости.

Иначе выглядит ситуация в случае микродупликации arr[hg19] chr12q24.1 2q24.13 (112184121_112308929)×3 размером 124,81 kb, содержащей три гена – *ALDH2*, *MAPKAPK5*, *ACAD10*. Частота данного варианта в DGV составляет 0,28%; в ClinVar сообщается о восьми доброкачественных микродупликациях; в DECIPHER описаны девять вариантов, идентичных выявленному в настоящем исследовании, и еще 23 CNV с тем же генным составом неизвестного клинического значения и, вероятно, доброкачественных. В 17 из 32 случаев, приведенных в базе DECIPHER, микродупликации были унаследованы от родителей. У 16 пациентов при описании фенотипа не упоминается ВПС. С высокой вероятностью для нашей пациентки данная микродупликация клинически неспецифична и является полиморфной.

Микродупликация chr9p24.1(7098178_7800079) ×3 размером 701,9 kb была выявлена у девочки с комплексным пороком сердца и крупных сосудов, синдромом гетеротаксии. CNV содержит два гена – *TMEM261* и *KDM4C*. В DGV и ClinVar аналогичная CNV не зарегистрирована. В DECIPHER приводится информация об одной микродупликации неизвестного клинического значения, перекрывающейся на 70% с описанной нами и также включающей ген *TMEM261*. У 1 из 43 пациентов с аномалией Эбштейна была выявлена микроделеция, практически полностью лежащая внутри региона описываемой микродупликации, включая ген *TMEM261* [8]. Было показано, что TMEM261 взаимодействует с MEF2C (фактором транскрипции MADS-box), который наряду с TBX5 и GATA4 играет роль в дифференцировке кардиомиоцитов. При обследовании 2 256 пациентов с ВПС микродупликация, включающая только ген *KDM4C*, была обнаружена у одного пациента с пульмональным стенозом и не встречалась в контрольной группе, включающей 841 индивида [9]. Ген *KDM4C* кодирует деметилазу, функциональная активность которой оказывает влияние на экспрессию генов и сегрегацию хромосом человека и инициирует программы многолинейной соматической дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши [10]. Таким образом, данная микродупликация может рассматриваться как потенциально патогенная.

Представленные примеры микродупликаций демонстрируют, что ключевыми в принятии решения об их клинической значимости являются экспериментальные сведения о локализованных в пределах CNV генах-кандидатах, а также данные об особенностях их клинического проявления.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Литература

1. *Kearney H.M., Thorland E.C., Brown K.K. et al.* American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants // Genet. Med. 2011. V. 13, № 7. P. 680–685.
2. *Li T., Lu H., Shen C. et al*. Identification of epithelial stromal interaction 1 as a novel effector downstream of Krüppel-like factor 8 in breast cancer invasion and metastasis // Oncogene. 2014. V. 33, № 39. P. 4746–4755.
3. *Kyuno J., Massé K., Jones E.A.* A functional screen for genes involved in *Xenopus pronephros* development // Mech. Dev. 2008. V. 125, № 7. P. 571–586.
4. *Zhang B., Peñagaricano F., Driver A. et al.* Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos // J. Dairy Sci. 2011. V. 94, № 8. P. 4174–4182.
5. *Silversides C.K., Lionel A.C., Costain G. et al.* Rare Copy number variations in adults with tetralogy of fallot implicate novel risk gene pathways // PLoS Genet. 2012. V. 8 (8). P. e1002843.
6. *Erdogan F., Larsen L.A., Zhang L. et al.* High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease // J. Med. Genet. 2008. V. 45, № 1. P. 704–709.
7. *Molck M.C., Simioni M., Paiva Vieira T. et al.* Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease // J. Pediatr (Rio J). 2017. V. 93, № 5. P. 497–507.
8. *Sicko R.J., Browne M.L., Rigler S.L. et al.* Genetic variants in isolated ebstein anomaly implicated in myocardial development pathways // PLoS One. 2016. V. 11 (10). P. e0165174.
9. *Soemedi R., Wilson I.J., Bentham J. et al.* Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 91. № 3. P. 489–501.
10. *Tomaz R.A., Harman J.L., Karimlou D. et al.* Jmjd2c facilitates the assembly of essential enhancer-protein complexes at the onset of embryonic stem cell differentiation // Development. 2017. V. 144, № 4. P. 567–579.

РОЛЬ МУТАЦИИ *BRAF*-V600E В ИЗМЕНЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ, РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ, КОМПОНЕНТОВ AKT/M-TOR СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В ТКАНИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.В. Спирина[1, 2], С.Ю. Чижевская[1], Е.Л. Чойнзонов[1, 2], И.В. Кондакова[1], Н.В. Тарасенко[2, 3]

[1] Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск
[3] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Папиллярная карцинома является наиболее частой злокачественной опухолью щитовидной железы (60% всех случаев злокачественных патологий данной локализации) и характеризуется высокой частотой регионарного метастазирования. Развитие злокачественных опухолей щитовидной железы ассоциировано с возникновением ряда генетических нарушений, что способствует вовлечению в механизмы опухолей прогрессии MAPK (mitogen-activated protein kinase) и AKT/m-TOR сигнальных каскадов. Одной из инициирующих мутаций развития рака щитовидной железы является *BRAF*-V600E, которая приводит к активации различных сигнальных каскадов и изменению продукции транскрипционных и ростовых факторов. Известно, что для папиллярного рака щитовидной железы характерна активация экспрессии транскрипционных факторов NF-κB и HIF-2α, а также AKT/m-TOR сигнального каскада. Однако связь уровня мРНК транскрипционных, ростовых факторов и компонентов AKT/m-TOR пути у пациентов в зависимости от наличия мутации в гене *BRAF* до сих пор не изучена.

Цель работы заключалась в исследовании экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, ростовых факторов VEGF, CAIX и VEGFR2, компонентов AKT/m-TOR сигнального пути у больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от наличия мутации *BRAF*-V600E.

Материал и методы. В исследование было включено 40 больных папиллярным раком щитовидной железы со стадией опухолевого процесса T1-4N0-2M0. Уровень мРНК изучаемых показателей определялся методом ПЦР в режиме реального времени. Мутацию *BRAF*-V600E определяли в аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. При наличии сходных клинико-морфологических параметров у пациентов с отсутствием и наличием мутации *BRAF*-V600E выявлены и молекулярно-биологические отличия. Присутствие мутантной формы гена в опухоли сопровождалось снижением уровня мРНК киназ AKT, cRAF, GSK-3β и ростом экспрессии ядерных факторов NF-κB p65, HIF-1 и ростового фактора VEGF.

Заключение. Для пациентов с папиллярным раком щитовидной железы характерно отсутствие различий в клинико-морфологических характеристиках заболевания в зависимости от статуса гена *BRAF*-V600E. Выявлены биологические параметры, ассоциированные с данной соматической мутацией. Отмечено возрастание уровня мРНК ростовых и транскрипционных факторов при снижении активности AKT/m-TOR сигнального пути.

СЛУЧАЙНАЯ НАХОДКА ДЕЛЕЦИИ РЕГИОНА, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕН *PMP22*, ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКОГО ЭКЗОМА

Н.В. Тарасенко[1, 2], Н.П. Бабушкина[1], А.А. Кашеварова[1], Т.В. Саприна[2], Т.А. Милованова[2], К.В. Трубченко[2], О.В. Лежнина[1], М.С. Назаренко[1, 2]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Пациентка Е., 38 лет, была направлена на молекулярно-генетическое обследование для уточнения диагноза: сахарный диабет взрослого типа у молодых, тип 2 (maturity onset diabetes of the young 2 (MODY2, OMIM 125851). Из анамнеза известно, что пациентка заболела в возрасте 36 лет, изначально был поставлен диагноз «сахарный диабет, тип 2», однако, учитывая нетипичное для данного типа диабета течение заболевания, молодой возраст и наличие сахарного диабета у родственника первой степени родства (мать пациентки), выставлен диагноз MODY2.

Выделение ДНК выполнено из лейкоцитов венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом. Массовое параллельное секвенирование (MPS) проведено с использованием наборов для приготовления ДНК-библиотек клинического экзома (Clinical Exome Solution™, SOPHiA GENETICS) на секвенаторе NextSeq550 (Illumina). Биоинформатический анализ данных выполнен с помощью SOPHiA AI и платформы SOPHiA DDM (SOPHiA GENETICS). В результате анализа клинического экзома с помощью технологии MPS не было обнаружено патологических мутаций в генах, связанных с подтипами MODY (*HNF4A*, *HNF1A*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*, *PCBD1*, *TRMT10A*), в том числе и в гене *GCK*, мутации в котором приводят к развитию MODY2. Однако

было выявлено несколько мутаций, в том числе и вариации числа копий участков ДНК (CNV), которые необходимо подтвердить с помощь альтернативных молекулярно-генетических методов.

Одной из неожиданных находок была протяженная делеция размером 1,1–1,6 Мб (chr17:(14063290_14110117)-(15164065_15687866)), включающая последовательность экзона 7 гена *COX10* и экзона 1 гена *PMP22.* Делеция подтверждена с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с праймерами на экзон 7 гена *COX10*, экзоны 2 и 4 гена *PMP22* и STR-маркер D17S1358, локализованный между данными генами.

Мутации в локусе 17p11.2-12 в области гена *PMP22* вызывают несколько наследственных заболеваний: синдром Шарко – Мари – Тута, тип 1E (наследственная моторно-сенсорная нейропатия с аутосомно-доминантным типом наследования, OMIM 118300), болезнь Дежерина – Сотта (гипертрофическая невропатия с аутосомно-доминантным типом наследования, OMIM 145900) и наследственная компрессионная нейропатия (наследственная невропатия с предрасположенностью к параличам от сдавления (ННПС), аутосомно-доминантный тип наследования, OMIM 162500).

Синдром Шарко – Мари – Тута, тип 1E, ассоциирован с тяжелой нейросенсорной тугоухостью, которая проявляется как в младенчестве и раннем детском возрасте, так и на втором и третьем десятилетиях жизни [1].

Болезнь Дежерина – Сотта имеет начало чаще в младенческом или раннем детском возрасте, проявляется задержкой моторного развития вследствие тяжелой дистальной двигательной и сенсорной недостаточности. Отмечается значительное снижение скорости проводимости нерва (иногда менее 10 м/с). Биопсия и гистологическое исследование нерва показывают серьезную потерю миелинизированных волокон [1].

Типичное проявление ННПС характеризуется эпизодическими безболезненными компрессионными рецидивирующими мононевропатиями нервных стволов, в том числе и черепно-мозговых нервов [1]. Встречаются случаи ННПС, которые ограничиваются единичным эпизодом пареза, что приводит к неправильной диагностике. Возникновению приступа предшествует небольшая компрессия пораженного нерва. ННПС характеризуется смешанным сенсорным дефицитом, который возникает вследствие «колбасообразных» отеков миелиновой оболочки как в чувствительных, так и в двигательных нервах – томакулярная невропатия. Наблюдаются приступы онемения, мышечной слабости, снижение или отсутствие сухожильных рефлексов. Чаще поражаются малоберцовый и локтевой нервы (30–48% и 21–28% соответственно), далее следуют плечевое сплетение (12–27%), лучевой нерв (4–13%) и срединный нерв (4–11%). Появление первых симптомов чаще всего возникает на втором и третьем десятилетии жизни. У большинства пациентов (60–70%) имеется одна очаговая острая невропатия [2].

Для ННПС характерно бессимптомное течение в пределах 6–23% случаев в семье, а также большая клиническая вариабельность между пациентами. Мутации *de novo* регистрируются в 20% случаев. Несмотря на отсутствие клинической симптоматики, у носителей делеции в гене *PMP22* имеются отклонения в электрофизиологических параметрах, а именно: увеличение латентных дистальных двигательных функций, особенно срединных и малоберцовых нервов, замедление очаговой моторики в местах захвата, чаще в локтевом нерве локтевого сустава, чем в малоберцовом нерве в малоберцовой головке. Наблюдается снижение скорости проводимости и амплитуды потенциала действия чувствительных нервов. Гистологическое исследование нервов показывает сегментарную де- и ремиелинизацию, варьирующую по количеству потери волокон [2].

В описываемом нами случае на момент направления на молекулярно-генетическое обследование у пациентки не было жалоб, которые можно было бы отнести к одной из описанных выше нозологических форм. Однако в данном случае необходимо более детально обследовать пациентку и ее ближайших родственников (родителей, детей) в отношении ННПС. Обследование должно включать как молекулярно-генетический анализ делеции в гене *PMP22*, так и обследование у невролога, а также проведение электрофизиологического исследования.

Таким образом, секвенирование клинического экзома с помощью технологии MPS позволяет определить генетические варианты, не только являющиеся причинными в отношении заболевания, но и клинически не прявляющиеся на момент обследования индивида.

Работа частично проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Литература

1. База данных Online Mendelian Inheritance in Man. URL: http://omim.org.
2. *Li J., Parker B., Martyn C. et al.* The *PMP22* gene and its related diseases // Mol. Neurobiol. 2013. V. 47 (2). P. 673–698.
3. *Paassen B.W. van, Kooi A.J. van der, Spaendonck-Zwarts K.Y. van et al.* PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies // Orphanet. J. Rare Dis. 2014. V. 9. P. 38.

INV DUP DEL 8P: НАСКОЛЬКО *DE NOVO*?

А.А. Твеленёва, Д.А. Юрченко, Н.В. Шилова

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

Синдром инвертированной дупликации со смежной делецией 8p (inv dup del 8p) – редкая хромосомная аномалия, частота которой составляет 1 случай на 10–30 тыс. населения [1]. На сегодняшний день описано более 50 постнатальных случаев. Клиническими проявлениями данного синдрома являются умственная отсталость, лицевые дисморфии, пороки развития ЦНС (гипоплазия/агенезия мозолистого тела), сколиоз/кифоз, гипотония, врожденные пороки сердца. Молекулярно-генетическая природа синдрома inv dup del 8p обусловлена наличием двух блоков сегментных дупликаций (SD), фланкирующих область размером 5 млн п.н. в районе 8p23.1, что является субстратом для эктопической рекомбинации. Изначально считалось, что *de novo* inv dup del 8p может произойти вследствие внутрихроматидной неаллельной гомологичной рекомбинации между блоками SD или вследствие U-типа обмена между сестринскими хроматидами, инициированного премейотическими двухцепочечными разрывами [2]. Однако O. Shimokawa и соавт. показали, что inv dup del 8p может являться результатом патологической мейотической сегрегации парацентрической инверсии у одного из родителей [3]. Кроме этого, нельзя исключить и носительство инвертированной интрахромосомной внутриплечевой инсерции, патологическая мейотическая сегрегация которой также приводит к образованию инвертированной дупликации со смежной делецией. Конечным результатом всех возможных механизмов является образование дицентрической хромосомы, которая в анафазе II претерпевает разрыв с образованием гамет с inv dup del 8p [4].

Механизм наследственных случаев inv dup del 8p считается достаточно дискуссионным. Известно, что инверсионный полиморфизм в районе 8p23.1 распространен в европейской популяции с частотой 26%. Согласно данным N. Bosch и соавт., парацентрическая инверсия короткого плеча хромосомы 8 в нормальной популяции встречается в мозаичной форме [5]. По данным большинства публикаций, для выявления носительства парацентрической инверсии у родителей пробанда выбраны FISH или GTG методы исследования, однако при таком подходе отмечается несколько недостатков. Во-первых, размер предполагаемой инверсии (до 5 млн п.н.) не позволяет однозначно интерпретировать результаты GTG-анализа, что может приводить к ложноотрицательным результатам при выявлении парацентрической инверсии [2]. Во-вторых, при FISH-исследовании метафазных хромосом не всегда указывается количество проанализированных клеток [1, 3]. Данный параметр является важным, так как в нормальной популяции инверсионный полиморфизм в районе 8p23.1 представлен в мозаичной форме с преимущественным преобладанием одного из клонов. Таким образом, не установлено, является ли выявленная инверсия у одного из родителей регулярной или мозаичной. В-третьих, в большинстве работ цитогенетическое или молекулярно-цитогенетическое исследование проводили исключительно у матерей, ссылаясь на работу O. Shimokawa, который на пяти случаях inv dup del 8p показал, что данная структурная перестройка имеет материнское происхождение [3]. Такой подход является не совсем правильным, так как частота инверсии в районе 8p23.1 среди общей популяции достаточно высока независимо от пола.

Таким образом, сформулирована **цель данного исследования** – определить наличие и форму (мозаичная/регулярная) парацентрической инверсии в группе родителей пробандов с синдромом inv dup del 8p и в выборке нормальных индивидуумов, в которую вошли мужчины и женщины, имеющие двух и более фенотипически нормальных детей.

Для реализации данной задачи применяли FISH-метод на метафазных хромосомах. В качестве зондов для гибридизации использовали продукты амплификации, полученные методом ПЦР длинных фрагментов и меченные в реакции Nick-трансляции соответствующим флуорофором. Для детекции парацентрической инверсии изготовлены два зонда длиной порядка 30 тыс. п.н. на регионы chr8 (hg19): 8,145,883–8,175,123 и chr8 (hg19): 11,612,228–11, 642,422. Для дифференциальной диагностики инвертированной внутриплечевой интрахромосомной инсерции от парацентрической инверсии использовали метод fiber-FISH с аналогично конструированными зондами.

Изучение точного механизма формирования наследственных случаев inv dup del 8p необходимо для оценки генетического риска, а данные, свидетельствующие об одинаковом результате при патологической мейотической сегрегации парацентрическойинверсииинвертированнойинтрахромосомной внутриплечевой инсерции, делают актуальным создание протокола, способного выявлять и дифференцировать их.

Литература

1. *García-Santiago F.A., Martínez-Glez V., Santos F. et al.* Analysis of inv dup del(8p) rearrangement: Clinical, cytogenetic and molecular characterization // Am. J. Med. Genet. A. 2015. V. 167A (5). P. 1018–1025.
2. *Yu S., Graf W.D.* Telomere capture as a frequent mechanism for stabilization of the terminal chromosomal deletion associated with inverted duplication // Cytogenet. Genome Res. 2010. V. 129 (4). P. 265–274.
3. *Shimokawa O., Kurosawa K., Ida T. et al.* Molecular characterization of inv dup del(8p): analysis of five cases // Am. J. Med. Genet A. 2004. V. 128A (2). P. 133–137.
4. *Madan K., Nieuwint A.W.M.* Reproductive risks for paracentric inversion heterozygotes: inversion or insertion? That is the question // Am. J. Med. Genet. 2002. V. 107. P. 340–343.
5. *Bosch N., Morell M., Ponsa I. et al.* Nucleotide, cytogenetic and expression impact of the human chromosome 8p23.1 inversion polymorphism // PLOS ONE. 2009. V. 4 (12). P. e8269.

CNV И АСИММЕТРИЧНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ Х-ХРОМОСОМЫ У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Е.Н. Толмачева[1, 2], Н.А. Скрябин[1], М.Е. Лопаткина[1], А.А. Кашеварова[1], Л.А. Затула[2], Е.А. Фонова[1, 2], И.Н. Лебедев[1, 2]

[1] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск
[2] Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Инактивация одной из Х-хромосом в клетках женского организма необходима для компенсации дозы Х-сцепленных генов между полами, это эпигенетический процесс, который заканчивается после имплантации и в норме происходит равновероятно. Асимметричная инактивация Х-хромосомы (sXCI – skewed X chromosome inactivation) может возникать либо из-за мутаций в центре инактивации в регионе Xq12, либо формироваться вторично вследствие мутаций на одной из Х-хромосом, которые могут либо увеличивать, либо уменьшать скорость пролиферации и жизнеспособность пула клеток. Одной из причин формирования sXCI, вероятно, могут быть и вариации числа копий участков ДНК (Copy Number Variations (CNV)).

Целью настоящего исследования явилась идентификация Х-сцепленных CNV у женщин с невынашиванием беременности, патогенетические эффекты которых могут быть компенсированы у женщин-носительниц за счет экстремальной sXCI, но проявляться у ее потомков и приводить к нарушению эмбрионального развития, несовместимого с живорождением.

Мы проанализировали характер инактивации в образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови и эндометрия 203 женщин с невынашиванием беременности, при этом 149 женщин имели единственный случай спонтанного аборта в анамнезе, а у 54 женщин имелось привычное невынашивание беременности (ПНБ). Критерием ПНБ было наличие у женщины двух и более спонтанных абортов. Контрольной группой являлись образцы ДНК периферической крови 97 женщин без проблем с репродукцией, имеющих две и более удачно завершившиеся беременности.

Для анализа характера инактивации Х-хромосомы был использован классический метод, основанный на амплификации высокополиморфного экзона 1 гена рецептора андрогена (*AR*) и метил-чувствительной количественной ПЦР. Продукты ПЦР разделяли с помощью фрагментного анализа. Степень Х-инактивации ≥90% принималась как экстремальная sXCI. Молекулярное кариотипирование с помощью сравнительной геномной гибридизации проводилось на микрочипах SurePrint G3 Human CGH array 4×180K (Agilent Technologies, США).

В группе женщин с невынашиванием беременности частота экстремальной sXCI была статистически значимо выше, чем у женщин без проблем с репродукцией, и составила 9 и 3% соответственно (точный критерий Фишера, p = 0,04). Частота sXCI в группе женщин с привычным невынашиванием беременности составила 24% и была выше, чем у женщин с единственной потерей беременности в анамнезе (17%), хотя отличия не являлись статистически значимыми.

Полученные нами результаты в целом соответствуют данным литературы. В нормальной популяции избирательная инактивация одной из родительских Х-хромосом встречается у 1,5–7% здоровых женщин [1], тогда как у женщин с невынашиванием беременности частота sXCI может достигать 16–17% [2]. Однако до настоящего времени практически не проводился анализ микроперестроек на Х-хромосоме у женщин с экстремальным смещением Х-инактивации и невынашиванием беременности. Поэтому мы провели поиск потенциально патогенетически значимых Х-сцепленных CNV, которые могут быть ассоциированы с формированием асимметричной инактивации у женщины и гибелью ее эмбриона, у 19 женщин, имеющих sXCI ≥90%. У восьми женщин были выявлены как микроделеции, так и микродупликации на Х-хромосоме. У четырех женщин на Х-хромосоме были обнаружены микродупликации в сегменте Xq28 размером от 35,77 до 782,7 kb, захватывающие гены: *GDI1* (пациентки 5 и 8); *L1CAM*, *AVPR2* (пациентка 6); *VBP1*, *RAB39B*, *CLIC2*, *TMLHE-AS1*, *H2AFB2*, *H2AFB3*, *H2AFB1*, *F8A1*, *F8A3*, *F8A2*, *MIR1184-3*, *MIR1184-2*, *MIR1184-1*, *SPRY*, *VAMP7*, *IL9R* (пациентка 4). У пациентки 4 мы также обнаружили микродупликацию размером 715 kb в регионе Xp22.33 (включает гены *PLCXD1*, *GTPBP6*, *LINC00685*, *PP2R3B*, *SHOX*, *CRLF2*, *CSF2RA*, *MIR3690*, *MIR3690-2*, *IL3RA*, *SLC25A6*, *ASMTL-AS1*, *ASMTL*, *P2RY8*, *AKAP17A*, *ASMT*), а у пациентки 2 была выявлена частично перекрывающаяся дупликация в регионе Xp22.33 размером 1,7 Mb, захватывающая гены *PLCXD1*, *GTPBP6*, *LINC00685*, *PP2R3B*, *SHOX*, *CRLF2*, *CSF2RA*, *MIR3690*, *MIR3690-2*, *IL3RA*, *SLC25A6*, *ASMTL-AS1*, *ASMTL*, *P2RY8*, *AKAP17A*, *ASMT*. Кроме того, были выявлены микроделеции в сегменте Xq24 у двух пациенток. Пациентка 8 имела микроделецию размером 36,53 kb, в которую вошли два гена: *WDR44* и *MIR1277*. Мы провели анализ обогащения генов, локализованных в регионах Х-сцепленных CNV (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr), и установили, что наибольшее число генов связано с умственной отсталостью (p = 0,0043, это гены *RAB39B*, *UBE2A*, *L1CAM*, *CLIC2*) и острым лимфоцитарным лейкозом (p = 0,0007, гены *R2RY8*, *CLIF2*). С Х-сцепленными формами когнитивного расстройства связаны также гены *GDI1* и *CXorf56* (OMIM 300815 и 300815).

Таким образом, наше исследование является одним из первых, в котором были проанализированы как генный состав микроперестроек на Х-хромосоме, так и эпигенетические аберрации на данной хромосоме у женщин с невынашиванием беременности.

Работа проведена на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского

НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-015-00437.

Литература

1. *Kuo P.L., Huang S.C., Chang L. et al.* Association of extremely skewed X-chromosome inactivation with Taiwanese women presenting with recurrent pregnancy loss // J. Formosan Med. Assoc. 2008. V. 107. P. 340–343.
2. *Sui Y., Chen Q., Sun X.* Association of skewed X chromosome inactivation and idiopathic recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis // Reprod. Biomed. Online. 2015. V. 31. P. 140–148.
3. *Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W.P. et al.* Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // Hum. Reprod. 2010. V. 25. P. 2913–2922.
4. *Pauta M., Grande M., Rodriguez-Revenga L. et al.* Added value of chromosomal microarray analysis over karyotyping in early pregnancy loss: systematic review and meta-analysis // Ultrasound Obstet. Gynecol. 2018. V. 51. P. 453–462.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТОДА FISH ПРИ НЕРАВНОМЕРНОМ ВНУТРЕННЕМ ОБЛУЧЕНИИ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЬНОГО ПОДХОДА

Е.И. Толстых, М.О. Дегтева, А.В. Возилова, А.В. Аклеев

Уральский научно-практический центр радиационной медицины, г. Челябинск

Анализ хромосомных аберраций в Т-лимфоцитах периферической крови признан в качестве одного из важных методов биодозиметрии [1]. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) позволяет оценивать число стабильных хромосомных аберраций (транслокаций) в лимфоцитах крови человека через десятилетия после радиационного воздействия. Существуют калибровочные кривые, связывающие число транслокаций с известной дозой облучения, рекомендованные для оценки дозы на красный костный мозг (ККМ) у донора [2]. Однако анализ данных FISH у лиц, облучившихся за счет ^{90}Sr в 1950-х гг. на реке Тече, показал, что оценка доз с использованием данных по частоте транслокаций приводит к занижению реальной дозы на ККМ, оцененной на основе измерений содержания ^{90}Sr в организме [3]. Это заставляет предположить, что при локальном облучении ККМ часть Т-клеток, сформированных до начала облучения, может получить значительно более низкие дозы. Изучение динамики Т-клеток привело к созданию модели облучения Т-лимфоцитов с учетом облучения части Т-клеточных предшественников в костном мозге, облучения Т-лимфоцитов в экстраскелетных лимфоидных тканях и рециркуляции лимфоцитов в красном костном мозге [4]. Модель основана на концепции Т-клеточного рода (T-Genus), который объединяет всех потомков Т-предшественников с наследуемыми специфическими аберрациями, которые могли образоваться в костном мозге. Модель в частности использует результаты математического моделирования гомеостаза Т-лимфоцитов [5, 6]. Задачи настоящей работы: обобщить экспериментальные данные по цитогенетическим исследованиям стабильных хромосомных аберраций у жителей прибрежных сел реки Течи за период 1994–2012 гг.; рассчитать для каждого донора дозу на Т-лимфоциты на основе разработанного модельного подхода; оценить зависимость «доза – эффект» и определить частоту транслокаций на 1 Гр дозы; сопоставить полученные значения с аналогичными показателями, полученными после внешнего равномерного облучения рабочих ядерных предприятий [7].

Цитогенетические исследования стабильных хромосомных аберраций были выполнены для 178 доноров. Во всех случаях использовали цельнохромосомные зонды для окрашивания трех пар хромосом, которые покрывали около 23% генома. Подсчет аберраций был выполнен в цитогенетических лабораториях нескольких научных центров: в УНПЦ РМ (Россия); в Институте радиобиологии им. Гельмгольца (Германия); в лаборатории Public Health England (Великобритания); а также в Лейденском университетском медицинском центре (Нидерланды). Протоколы FISH и подробные описания подсчета хромосомных аберраций были описаны ранее [3]. Полученные цитогенетические данные использовались для верификации модели облучения Т-лимфоцитов. В качестве показателя использовали выход числа транслокаций на 1 Гр дозы облучения.

В результате для выбранной группы доноров было выполнено два варианта расчетов дозовой зависимости частоты транслокаций с использованием модуля AMFIT программного пакета EPICURE [8]. Во-первых, была оценена частота транслокаций на 1 Гр дозы на ККМ (дозы оценивались на основе индивидуальных дозиметрических данных по измерениям ^{90}Sr в теле). Частота составила $(8{,}0 \pm 0{,}7) \cdot 10^{-3}$ транслокаций на GE (геном-эквивалент) на 1 Гр. Во-вторых, была оценена частота транслокаций на 1 Гр дозы на Т-лимфоциты (дозы оценивались на основе разработанных модельных подходов и были в целом ниже, чем дозы на ККМ). Искомая частота составила $(11{,}8 \pm 1{,}2) \cdot 10^{-3}$ транслокаций на GE на 1 Гр. Для сравнения были использованы результаты оценки параметра «доза – эффект» для доноров, подвергшихся профессиональному облучению от внешних гамма-источников [7], для которых дозы облучения ККМ и периферических лимфоидных тканей практически совпадают. В этом исследовании, выполненном на основе FISH, для построения линейной регрессии Пуассона также использовали модуль AMFIT программного пакета EPICURE. Частота транслокаций по этим данным составила $(11{,}6 \pm 1{,}6) \cdot 10^{-3}$ на 1 Гр на GE, что хорошо согласуется с нашими результатами, полученными для доноров из прибрежных сел реки Течи на основе модели облучения Т-лимфоцитов. Подобная успешная верификация модели позволяет рекомендовать ее для использования при интерпретации результатов FISH, когда имело место локальное облучение ККМ.

Таким образом, при неравномерном облучении тела человека, например в результате накопления изотопов стронция в костной ткани, при цитогенетических исследованиях необходимо учитывать сложную динамику Т-клеток, которая зависит от возраста. Концепция T-Genus позволила разработать модель для оценки доли Т-лимфоцитов, облучившихся в разных участках тела (ККМ, периферический пул), которые могут накапливать различные дозы облучения. Использование модели позволяет корректно интерпретировать результаты цитогенетических исследований.

Работа была поддержана Федеральным медико-биологическим агентством России и Департаментом энергетики США в рамках Российско-американского проекта 1.1.

Авторы выражают благодарность С. Епифановой за помощь в работе с программой EPICURE.

Литература

1. IAEA Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual Technical Reports Series 405. 2001. URL: http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/6303/Cytogenetic-Analysis-for-Radiation-Dose-Assessment-A-Manual.
2. *Edwards A.A., Lindholm C., Darroudi F. et al.* Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications // Radiat. Prot. Dosimetry. 2005. V. 113, № 4. P. 396–402.
3. *Vozilova A.V., Shagina N.B., Degteva M.O. et al.* FISH analysis of translocations induced by chronic exposure to Sr radioisotopes: second set of analysis of the Techa River Cohort // Radiat. Prot. Dosimetry. 2014. V. 159, № 1–4. P. 34–37.
4. *Tolstykh E.I., Degteva M.O., Vozilova A.V., Anspaugh L.R.* Local bone-marrow exposure: how to interpret the data on stable chromosome aberrations in circulating lymphocytes? (some comments on the use of FISH method for dose reconstruction for Techa riverside Residents) // Radiat. Environ. Biophys. 2017. V. 56, № 4. P. 389–403.
5. *Bains I.* Mathematical modelling of T cell homeostasis. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy of the University College London. 2010. URL: http://discovery.ucl.ac.uk/20159/1/20159.pdf.
6. *Bains I., Yates A.J., Callard R.E.* Heterogeneity in thymic emigrants: implications for thymectomy and immunosenescence // PLoSOne. 2013. V. 8 (2). P. e49554.
7. *Tawn E.J., Curwen G.B., Jonas P. et al.* Chromosome aberrations determined by fish in radiation workers from the sellafield nuclear facility // Radiat. Res. 2015. V. 184, № 3. P. 296–303.
8. Hirosoft. Epicure: Fast, interactive software for the analysis of medical, public health, epidemiologic, econometric, and reliability data V. 2.10. 1998. Seattle, WA: Hirosoft International Corporation.

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ И ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ Y-АУТОСОМНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ

И.Л. Трофимова[1, 2, 3], А.Ф. Сайфитдинова[1, 4], Ю.А. Логинова[5], А.А. Кинунен[1, 6], З.Н. Тонян[2], Ю.Р. Пастухова[1], О.А. Леонтьева[1], Р.А. Кузнецова[1], О.Г. Чиряева[3, 7], О.С. Глотов[7, 8], И.В. Полякова[8], С.Г. Щербак[8, 9], Н.К. Бичевая[1]

[1] Международный центр репродуктивной медицины, г. Санкт-Петербург
[2]Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, г. Санкт-Петербург
[3] Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург
[4] Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, г. Санкт-Петербург
[5] DiaCarta, Inc, 2600 Hilltop Drive, Richmond, CA 94806, USA
[6] Диагностический центр (медико-генетический), г. Санкт-Петербург
[7] Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург
[8] Городская больница № 40, г. Сестрорецк
[9] Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Несбалансированные Y-аутосомные транслокации встречаются с частотой 1 : 2 000 в популяции. Носители таких перестроек фенотипически нормальны, но могут иметь репродуктивные проблемы, связанные с нарушением формирования полового бивалента и сегрегации хромосом в мейозе. Имеются данные о повторных самопроизвольных абортах, мертворождениях или рождениях детей с аномальным фенотипом в семьях, где супруг является носителем Y-аутосомной транслокации. Поскольку наиболее часто в образование таких транслокаций вовлечены материал сателлитной ДНК района Yq12 и короткое плечо хромосомы 15, то обсуждается возможное участие подобных перестроек в последующем возникновении микроделеций и нерасхождении хромосом, что может приводить к риску развития болезней геномного импринтинга. Высказано предположение о том, что наследование женщинами вместе с гаметой отца дериватной аутосомы, содержащей материал конститутивного гетерохроматина, транслоцированного с Y-хромосомы, может быть связано с повышенным риском малигнизации яичников.

Развитие технологий сравнительной геномной гибридизации на микроматрицах (aCGH) и секвенирования нового поколения (NGS) существенно расширило возможности тестирования хромосомной патологии, в том числе и на доимплантационных этапах развития эмбрионов человека. Однако высокоповторяющиеся последовательности, такие как сателлитные ДНК, не поддаются анализу этими методами. Поэтому для семей, которые хотят исключить наследование дериватной аутосомы с транслоцированным гетерохроматином Y-хромосомы, возможно сочетать подходы с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на бластомерах третьего

дня развития с последующим анализом методами aCGH или NGS клеток трофэктодермы при проведении преимплантационного тестирования.

В работе было исследовано три семьи, в которых мужчины являлись носителями структурной хромосомной перестройки с вовлечением конститутивного гетерохроматина бэнда Yq12 и коротких плеч аутосом 15 и 22. Все супружеские пары были прокариотипированы. С помощью FISH с хромосом-специфичными зондами на препаратах метафазных хромосом из лимфоцитов периферической крови было проведено уточнение точек разрыва и подтверждена хромосом-специфичность используемых зондов.

На 42 бластомерах от эмбрионов третьего дня развития, полученных при биопсии в пяти циклах вспомогательных репродуктивных технологий, были проанализированы типы сегрегации хромосом. У носителей Y/15 и Y/22 транслокаций наблюдалось преимущественное наследование дериватной аутосомы (в 43% проанализированных клеток) при сегрегации по «совместному-1» типу, что может быть связано с нарушением формирования полового бивалента. В остальных бластомерах детектировали тип сегрегации 3 : 1 без преимущественного наследования дериватной аутосомы, а также мозаичные и полиплоидные хромосомные наборы. Чуть менее половины проанализированных бластомеров (45%) оказались анеуплоидными по аутосомам, не вовлеченным в перестройку.

Для трех эмбрионов с диагностированными анеуплоидиями также была выполнена диагностика с помощью NGS на клетках трофэктодермы. Два из трех проанализированных эмбрионов по результатам исследования методом FISH на третий день развития имели дериватную аутосому с материалом сателлитной ДНК района Yq12. Как и следовало ожидать, метод NGS не позволил выявить эти районы, в то же время анеуплоидии, обнаруженные на третий день развития, подтвердились в клетках трофоэктодермы.

В двух семьях по результатам диагностики сбалансированных эмбрионов получено не было, перенос эмбрионов не проводился. В третьей семье по результатам диагностики были получены два эмбриона мужского пола, сбалансированных по вовлеченным в транслокацию хромосомам и не содержащих дериватной аутосомы. С согласия супругов был проведен перенос данных эмбрионов, который завершился рождением в срок клинически здоровых близнецов мужского пола. От пренатального и постнатального кариотипирования супруги отказались.

Таким образом, комплексный подход с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации и технологии секвенирования нового поколения позволяет выявить у доимплантационных эмбрионов человека не только анеуплоидии по различным хромосомам, но и дериватную аутосому с транслоцированным материалом сателлитной ДНК Y-хромосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-00279).

КЛИНИКО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ СЛУЧАЕВ ИЗОДИЦЕНТРИЧЕСКОЙ ХРОМОСОМЫ Y

А.В. Чернова, И.А. Севостьянова, Н.В. Никитина, М.Г. Сумина, Т.А. Гапич, О.В. Лагутина

Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», г. Екатеринбург

Изодицентрические хромосомы представляют собой симметричные структуры, несущие две центромеры. Одна из центромер может инактивироваться, вызывая образование псевдоизодицентрической хромосомы. Перестроенные таким образом Y-хромосомы, как правило, митотически нестабильны и могут встречаться в виде мозаичных форм с клеточной линией 45,X. Фенотипические проявления изодицентричных Y-хромосом разнообразны – от нарушения фертильности до нарушения формирования пола и пороков развития и зависят от наличия и выраженности мозаицизма.

В 2018 г. в цитогенетической лаборатории клинико-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» (г. Екатеринбург) были выявлены два случая псевдоизодицентрической хромосомы Y.

Случай 1. Антенатально в клетках ворсин хориона определен кариотип 45,X. Инвазивная диагностика проводилась в связи с высоким риском хромосомной патологии у плода по данным комплекса пренатальной диагностики первого триместра. Ультразвуковых маркеров хромосомной патологии, а также врожденных пороков развития у плода выявлено не было. Однако во втором триместре обнаружено, что наружные половые органы у плода сформированы по мужскому типу. От уточняющей инвазивной диагностики семья отказалась. Ребенок родился в срок, имел умеренную пренатальную задержку массы тела и роста. Наружные половые органы сформированы по мужскому типу, с головчатой формой гипоспадии, яички находятся в мошонке. Других врожденных пороков развития и микроаномалий развития не выявлено. Ультразвуковое исследование органов малого таза, мошонки и паховой области патологии не выявило (мужской генитальный пол). Проведено стандартное цитогенетическое исследование культуры лимфоцитов периферической крови. Выявлено два клона клеток: клон с моносомией X и клон с хромосомой X и со структурно измененной хромосомой Y. Кариотип mos45,X[7]/46,X,derY[33]. Для идентификации дериватной хромосомы проведено исследование FISH-методом с использованием ДНК-зондов на центромерные районы хромосом X, Y и 18 (DXZ1, DYZ3, D18Z1) (MetaSystems) и набором зондов для определения локуса SRY (MetaSystems). В результате было установлено, что дериватная хромосома является псевдоизодицентриком по короткому плечу: 46,X,der(Y).ish psuidic(Y)(q11.2) (DYZ3++,SRY++,DYZ1-). Исследование на наличие

локусов AZF не проводилось. Таким образом, у ребенка кариотип с двумя клонами клеток: клон с псевдоизодицентрической хромосомой Y (превалирующий) и клон с моносомией X. Ребенок взят под наблюдение врачей уролога и эндокринолога.

Случай 2. Пациент Ж., 33 года. Родился вторым ребенком, недоношенным; рос, развивался соответственно возрасту. Фенотип без особенностей, рост – 175 см, масса тела – 68 кг. Обследование проходит по поводу бесплодия в течение 8 лет. Брак первый. В спермограмме – азооспермия. Назначено цитогенетическое исследование и анализ на микроделеции Y-хромосомы (AZF-фактор).

При анализе метафазных пластинок в хромосомных препаратах из культуры лимфоцитов периферической крови обнаружена аберрантная Y-хромосома. Кариотип 46,X,der(Y). Проведено исследование FISH-методом с использованием ДНК-зондов на центромерные районы хромосом X, Y и 18 (DXZ1, DYZ3, D18Z1) (MetaSystems) и набором зондов для определения локуса SRY (MetaSystems). С помощью молекулярно-цитогенетического исследования установлено, что аберрантная Y-хромосома является псевдоизодицентриком по короткому плечу. Кариотип пациента окончательно определен как 46,X,der(Y).ish psuidic(Y)(q11.2)(DYZ3++,SRY++,DYZ1-). Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Real-time PCR («Вектор-Бэст») обнаружена делеция локусов AZFa, AZFb, AZFc Y-хромосомы. По результатам обследования проведена консультация врачом-генетиком. Пациент информирован о характере выявленной патологии, обсуждены показания к вспомогательным репродуктивным технологиям с донорской спермой.

Таким образом, сочетание цитогенетических, FISH и молекулярных методов позволяет дать более полное представление о характере структурной перестройки и повысить прогностическое значение для пациента.

ПОДХОДЫ К СИСТЕМАТИЗАЦИИ ГОНОСОМНОГО МОЗАИЦИЗМА

В.Б. Черных[1, 2]

[1] Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва

Мозаицизм по половым хромосомам – гоносомный мозаицизм (ГМ) часто вызывает нарушения репродукции, аномалии половой системы, физического и умственного развития [1–3]. Он может затрагивать различные уровни организации генома, быть представлен как численными, так и структурными аномалиями гоносом, химеризмом (XX/XY), патогенными вариантами, копийностью (дозой) X- и Y-сцепленных генов, а также эпигенетическими изменениями. Эти генетические и эпигенетические изменения могут встречаться изолированно или в сочетании, быть независимыми или взаимосвязанными, возникать на различных этапах онтогенеза, имея различную представленность в разных органах и тканях в пренатальный и постнатальный периоды [1, 3]. Наличие гоносомного мозаицизма может оказывать влияние на фенотип, модифицировать клиническую картину генетических изменений половых хромосом. Поэтому многообразие описанных различных вариантов (типов) гоносомного мозаицизма требует систематизации.

Целью работы являлась разработка подходов к систематизации мозаицизма по изменениям генома, затрагивающим половые хромосомы человека.

В основу данной систематизации ГМ могут быть положены различные принципы (критерии), классифицирующие описанные ранее и возможные его варианты. Одним из таких принципиальных критериев является уровень организации генома, на котором имеется изменение. Согласно этому критерию гоносомный мозаицизм может быть по числу половых хромосом в различных клеточных линиях (клонах) по количеству Y- и (или) X-хромосом. При простом ГМ один из двух клонов эуплоидный, другой – анеуплоидный (например, X/XY, X/XX, XX/XXX, XY/XXY). В случае сложного ГМ в кариотипе присутствуют несколько анеуплоидных клонов, реже два эуплоидных клона и один анеуплоидный (например, XX/XY/XXY) [3].

Особое место среди вариантов ГМ занимает эуплоидный мозаицизм по набору гоносом (46,XX/46,XY). Данный тип ГМ может быть обусловлен истинным химеризмом с разным набором гоносом – гетерокариотипический химеризм, возникающий в результате ошибок оплодотворения или раннего эмбрионального развития, искусственным (посттрансплантационным) химеризмом и микрохимеризмом из-за общего фетоплацентарного кровотока. Изокариотипический химеризм характеризуется наличием одинакового кариотипа (набора гоносом) в клеточных линиях. Кариотип 46,XX/46,XY может являться как результатом химеризма, так и мозаицизма без химеризма, возникающего в результате постзиготического нерасхождения половых хромосом в анеуплоидной зиготе 47,XXY с образованием двух клеточных линий – 46,XX и 46,XY (феномен «восстановления из трисомии») [3].

Мозаицизм по структурной гоносомной перестройке, в том числе скрытой, может быть без анеуплоидии по гоносомам, но чаще встречается при наличии простого или сложного ГМ по перестроенной хромосоме с наличием анеуплоидного клона(ов) [4, 5]. Так, мозаицизм с наличием клона 45,X характерен для таких структурных аномалий гоносом, как кольцевые, изодицентрические и изохромосомы X и Y, которые характеризуются митотической нестабильностью и склонностью к нерасхождению и отставанию в анафазе митоза [2, 3]. Значительно реже в постнатальной цитогенетической диагностике выявляют мозаицизм по сбалансированной и

несбалансированной микроструктурной перестройке половых хромосом, например, по микроделеции, микродупликации, скрытой транслокации, инсерции или по генной мутации(ям), однородительской дисомии по гоносоме. Фенотипическое проявление последних может отсутствовать или быть слабовыраженным, стертым. Случаи мозаицизма по сбалансированной микроструктурной перестройке гоносом редки и не имеют клинической значимости и фенотипического проявления.

Еще одним уровнем организации генома, по изменению которого может быть мозаицизм по гоносомам, является эпигенетический. Мозаицизм по инактивированной хромосоме X влияет на экспрессию ее генов в различных клеточных линиях, подверженных X-инактивации (лайонизации), а процентное соотношение активных и неактивных X-хромосом отражает случайный или преимущественный характер инактивации. Следует отметить, что аномальная лайонизация часто сопровождает структурные аномалии хромосомы X или отдельных ее локусов, X-сцепленных мутаций, а также может сопровождать X-аутосомные транслокации и аутосомные анеуплоидии [3, 6].

Помимо уровня организации генома, по изменению которого имеет место гоносомный мозаицизм, можно выделить еще ряд критериев систематики ГМ (количество и представленность клонов в различных тканях, уровень мозаицизма и выявляемость его с помощью цитогенетического исследования или молекулярных методов и др.). Например, согласно митотической и мутационной устойчивости клеточных линий можно выделить стабильный и динамический мозаицизм, возникающий при симультатно повторяющихся мутациях и ведущий к образованию сложного мозаицизма с наличием клеточных линий, несущих различные структурные аномалии гоносом, например дицентрические, кольцевые хромосомы, терминальные делеции. По наличию, характеру и степени выраженности фенотипических проявлений можно выделить несиндромальный и синдромальный ГМ, вызывающий соответствующие мозаичные формы гоносомных синдромов (Клайнфельтера, Шерешевского – Тернера, трисомии X и др.). Согласно клинической значимости можно выделить клинически значимый и клинически незначимый ГМ, который может быть следствием микрохимеризма или низкоуровневого, в том числе физиологического, мозаицизма (например, по хромосоме X у женщин позднего репродуктивного возраста). Повышение уровня мозаицизма по хромосоме X может быть фактором риска различных нарушений репродукции (сниженная фертильность, ранняя аменорея), фактором риска развития нейродегенеративных заболеваний [7]. Однако проблема ГМ, в том числе по CNV и генным вариантам и эпигенетическим изменениям, его динамика и клиническая значимость остаются недостаточно изученными и требуют широкого использования комплексного исследования и глубокого фенотипирования.

Литература

1. *Баранов В.С., Кузнецова Т.В.* Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб.: Изд-во Н-Л, 2006. 640 с.
2. *Черных В.Б.* Гоносомные аномалии и CNV и их диагностика // Мед. генетика. 2018. Т. 17, № 10. С. 8–14.
3. *Gardner R.J.M., Amor D.J.* Chromosome abnormalities and genetic counseling. 5th ed. Oxford University Press, 2018. 634 p.
4. *Chernykh V.B., Kurilo L.F., Shilova N.V. et al.* Hidden X chromosomal mosaicism in a 46,XX male // Sex Dev. 2009. V. 3, № 4. P. 183–187.
5. *Chernykh V.B., Vyatkina S.V., Antonenko V.G. et al.* Unique mosaic X/Y translocation/insertion in infant 45,X male // Am. J. Med. Genet. A. 2008. V. 146A, № 24. P. 3195–3197.
6. *Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Суханова Н.Н. и др.* Асимметричная инактивация X-хромосомы у эмбрионов человека с мозаичной трисомией хромосомы 16 // Генетика. 2011. Т. 47, № 3. С. 401–405.
7. *Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Liehr T. et al.* X chromosome aneuploidy in the Alzheimer's disease brain // Mol. Cytogenet. 2014. V. 7 (1). P. 20.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ CNV

Н.В. Шилова

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

Хромосомные болезни являются одной из наиболее обширных групп в структуре наследственной патологии. Широкий спектр числовых и структурных аномалий хромосом требует применения разнообразных методов их детекции. Полногеномные технологии являются эффективным инструментом для выявления вариаций числа копий участков ДНК (copy number variations (CNV)), позволяя определять их точную локализацию в геноме, размер и генный состав. Широкое использование высокоразрешающих методов диагностики, таких как хромосомный микроматричный анализ (ХМА) и высокопроизводительное секвенирование, привело к открытию новых классов наследственных болезней, причиной возникновения которых являются микроструктурные перестройки хромосом, обусловленные клинически значимыми CNV в виде делеций, дупликаций и триплекаций. Использование ХМА позволяет повысить эффективность выявления клинически значимых CNVs до 20–55% у пациентов с идиопатической умственной отсталостью и множественными врожденными аномалиями развития, а также заболеваниями аутистического спектра [1–3].

Однако, несмотря на безусловные преимущества, геномные технологии не могут предоставить информацию о числе и структуре хромосом, вовлеченных в перестройку. Кроме того, одним из существенных недостатков этих методов является невозможность детекции сбалансированных хромосомных перестроек, в частности робертсоновских, реципрокных транслокаций, инверсий и инсерций [4]. Традиционный цитогенетический анализ и при необходимости молекулярно-цитогенетическое исследование родителей (и других родственников) при

обнаружении у ребенка субмикроскопических клинически значимых CNV позволяют выявлять сбалансированные хромосомные перестройки у родителей и других членов семьи. Идентификация механизма формирования и происхождения хромосомного дисбаланса крайне важны для оценки повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией, планирования тактики пренатальной диагностики при последующих беременностях и, если необходимо, преимплантационной генетической диагностики [5].

Интерпретация клинически значимых CNV должна проводиться с учетом особенностей мейотической сегрегации хромосом при различных структурных хромосомных перестройках. Двухсегментный хромосомный дисбаланс, выявленный при ХМА и представленный одновременным присутствием CNV в виде делеции и дупликации негомологичных хромосом или терминальной делецией одного плеча и дупликацией другого плеча одной хромосомы, как правило, является следствием патологической мейотической сегрегации реципрокных транслокаций или перицентрических инверсий соответственно, что определяет обязательное обследование родителей пациента для выявления носителя сбалансированной хромосомной аномалии. Определенный паттерн двухсегментного хромосомного дисбаланса характерен и для таких структурных перестроек, как кольцевая хромосома у пациентов с аномальным фенотипом и инвертированная дупликация со смежной делецией. Такие структурные хромосомные перестройки, как правило, являются спорадическими и не требуют дополнительного обследования родителей.

Односегментный хромосомный дисбаланс, когда при ХМА у пациента выявляют клинически значимые CNVs в виде либо делеции, либо дупликации, либо трипликации, может свидетельствавать как о наличии у пациента терминальной или интерстициальной делеции (дупликации), происхождение которых может быть как спорадическим, так и являться следствием патологической мейотической сегрегации родительской межхромосомной и внутрихромосомной инсерции, а также парацентрической инверсии [6, 7]. Поэтому в каждом случае выявления у ребенка с аномальным фенотипом CNV в виде односегментного хромосомного дисбаланса необходимо обследовать родителей для выявления носительства сбалансированных хромосомных перестроек. Известно, что при некоторых структурных хромосомных перестройках, например инсерциях, отмечается крайне высокий риск (до 50%) рождения ребенка с хромосомным дисбалансом, в отличие от спорадических случаев терминальной делеции (дупликации).

Комплексный подход в диагностике CNV, ассоциированных с умственной отсталостью и аномальным фенотипом у пациента, позволяет не только точно определять количество геномных копий отдельных участков ДНК, но и детализировать структуру и происхождение геномного дисбаланса, что в конечном счете определяет стратегию персонализированного медико-генетического консультирования.

Литература

1. *Miller D., Adam M., Aradhya S. et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies // Am. J. Hum. Genet. 2010. V. 86. P. 749–764.
2. *Ho K.S., Wassman E.R., Baxter A.L. et al.* Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders using an ultra-high resolution chromosomal microarray optimized for neurodevelopmental disorders // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17 (12). P. E2070.
3. *Fan Y., Wu Y., Wang L. et al.* Chromosomal microarray analysis in developmental delay and intellectual disability with comorbid conditions // BMC Med. Genomics. 2018. V. 11 (1). P. 49.
4. *Kang S-H., Shaw C., Ou G. et al.* Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results // Am. J. Med. Genet. 2010. V. 152A. P. 1111–1126.
5. *Bui T., Vetro A., Zuffardi O. et al.* Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosomal analysis necessary in the post-array CGH era? // Prenat. Diagn. 2011. V. 31. P. 235–243.
6. *Gardner R.J., Amor D.J.* Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (5 ed.). Oxford University Press, 2018.
7. *Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Дадали Е.Л., Шилова Н.В.* Интерхромосомная и интрахромосомная инсерции с участием хромосомы 2 // Мед. генетика. 2018. Т. 17, № 2. С. 12–17.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ С ПРОГРЕССИЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Т.Г. Шкаврова, Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко, Е.В. Голуб, А.А. Даниленко

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал НМИЦ радиологии Минздрава России, г. Обнинск

Актуальность. Исследования в области молекулярной биологии внесли большой вклад в понимание патогенеза многих гематологических заболеваний. К настоящему времени показано, что при гемобластозах часто выявляются высокоспецифичные генетические нарушения, имеющие диагностическое значение [1]. До сих пор остаются неясными причины патогенеза хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), а также факторы, влияющие на прогрессию заболевания. При ХЛЛ не обнаружено высокоспецифичных аберраций хромосом, тем не менее к настоящему времени показано, что выявление делеций в локусах 17p13, 11q22, 13q14 и трисомии хромосомы 12 имеет прогностическое значение [2]. Однако у больных с одинаковыми аберрациями хромосом также может наблюдаться вариабельность течения и прогноза заболевания: у одних пациентов заболевание развивается крайне медленно и признаки прогрессии заболевания отсутствуют годами, а у других наблюдается быстрая прогрессия с последующим неблагоприятным исходом. У некоторых больных ХЛЛ может трансформироваться в быстро прогрессирующую диффузную В-крупноклеточную лимфому (синдром Рихтера). Этиология синдрома

Рихтера до сих пор неизвестна. Поиск молекулярно-генетических нарушений, лежащих в основе появления опухолевого роста, выступает приоритетной задачей фундаментальных исследований.

Цель исследования – оценить молекулярно-цитогенетические нарушения у больных ХЛЛ с прогрессией заболевания.

Материал и методы. Исследование выполнено ретроспективно на архивных образцах периферической крови больных ХЛЛ, проходивших лечение в медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба с 2008 по 2011 г. В исследование включены 10 больных ХЛЛ с прогрессией заболевания. Использован метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) с применением коммерческих прямомеченных ДНК-проб для выявления трисомии хромосомы 12, делеций в локусах 17p13, 11q22, 13q14, 13q34, 9p21 и 20q13, а также нарушений в локусе 14q32 (Vysis, США). Верхние границы нормальных значений для трисомии хромосомы 12 составили <5%, del17p13 – <8%, del11q22 – <6%, del13q14 – <6%, del13q34 – <6%, t(14q32) – <7%, del14q32 – <8%, del9p21 – <5%, del20q13 – <5%. Все больные получали индивидуально подобранное лечение, схемы которого были адекватны периоду течения ХЛЛ. При прогрессии заболевания всем больным FISH-исследование выполнено до начала лечения.

Результаты. Результаты I-FISH у больных ХЛЛ с прогрессией заболевания представлены в таблице. Как видно из таблицы, у всех обследованных больных ХЛЛ с прогрессией заболевания при использовании стандартной для ХЛЛ молекулярно-цитогенетической панели наблюдались нарушения, характерные для этого заболевания. Добавление к этой панели ДНК-зондов для исследования нарушений с вовлечением генов *IGH*, *AURKA* и *CDKN2A* показало наличие у всех обследованных больных дополнительных нарушений: транслокации и делеции с участием гена *IGH* были выявлены у четверых и семи из 10 обследованных соответственно; потеря одной копии гена *AURKA* обнаружена у шести из восьми обследованных, а гена *CDKN2A* – у двух из четырех обследованных. Прогностическая значимость этих нарушений еще не изучена. Ген *AURKA* играет ключевую роль в передаче сигналов от поврежденной ДНК к разнообразным эффекторам, включая p53 сигнальный путь и частично сигнальные пути, критические для онкогенной трансформации клеток. Неправильная работа этого гена приводит к нарушениям реакций клетки на повреждения ДНК, что в том числе может выражаться в химио- и радиорезистентности опухолевых клеток [3]. В работах [4, 5] показано, что потеря *CDKN2A*, редко встречающаяся при ХЛЛ, может участвовать в патогенезе синдрома Рихтера. Делеции в локусе 9p21 подразумевают потерю генов *CDKN2A* и *CDKN2B*, кодирующих белки p16 и p15, а утрата активности этих генов ведет к инактивации белка Rb и провоцирует нерегулируемую пролиферацию клеток.

Результаты I-FISH у больных ХЛЛ с прогрессией заболевания

Показатель		Пациент									
		П1	П2	П3	П4	П5	П6	П7	П8	П9	П10
Возраст на момент постановки диагноза, лет		49	58	47	56	55	68	49	66	62	59
Синдром Рихтера		+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Общая выживаемость, мес.		33	40	42	56	68	89	133	Не достигнута		
Время наблюдения, мес.		33	40	42	56	68	89	133	110	63	204
		Доля клеток с нарушением, %									
Нарушение (ген)	del17p13 (*TP53*)	72	62	93	76	*	*	*	11	*	*
	del11q22 (*ATM*)	*	*	*	*	93	*	*	*	76	*
	del13q14 (*DLEU1*)	*	43	*	84	89	*	92	51	78	45
	del13q34	*	*	*	*	*	*	76**	*	*	*
	trisomy chr12	*	*	*	*	*	7	*	37	*	*
	t(14q32) (*IGH*)	*	*	*	*	11	27	*	31	9	*
	del14q32 (*IGH*)	*	42	82	82	32	*	83	12	35	*
	del20q13 (*AURKA*)	8	n	37	12	9	n	*	9	*	10
	del9p21 (*CDKN2A*)	32	*	48	n	n	n	n	n	n	*

Примечание. * – не превышает контрольный уровень, ** – амплификация 13q34, n – не исследовалась.

Таким образом, полученные предварительные данные показали, что у больных ХЛЛ с прогрессией заболевания наблюдаются множественные нарушения хромосом с вовлечением генов, играющих важную роль в канцерогенезе.

Литература

1. *Криволапов Ю.А., Леенман Е.Е.* Морфологическая диагностика лимфом. СПб.: КОСТА, 2006. 208 с.
2. *Захарова А.И., Обухова Т.Н.* Молекулярно-генетические маркеры как факторы прогноза при хроническом В-клеточном лимфолейкозе // Онкогематология. 2007. № 1. С. 17–23.
3. *Katsha A., Belkhiri A., Goff L., El-Rifai W.* Aurora kinase A in gastrointestinal cancers: time to target // Mol. Cancer. 2015. V. 14. P. 106.
4. *Chigrinova E., Rinaldi A., Kwee I. et al.* Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome // Blood. 2013. V. 122 (15). P. 2673–2682.
5. *Fabbri G., Khiabanian H., Holmes A.B. et al.* Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome // J. Exp. Med. 2013. V. 210 (11). P. 2273–2288.

НОВАЯ МУТАЦИЯ В ГЕНЕ *EXT2* У БОЛЬНЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЭКЗОСТОЗНОЙ ХОНДРОДИСПЛАЗИЕЙ В ЯКУТИИ

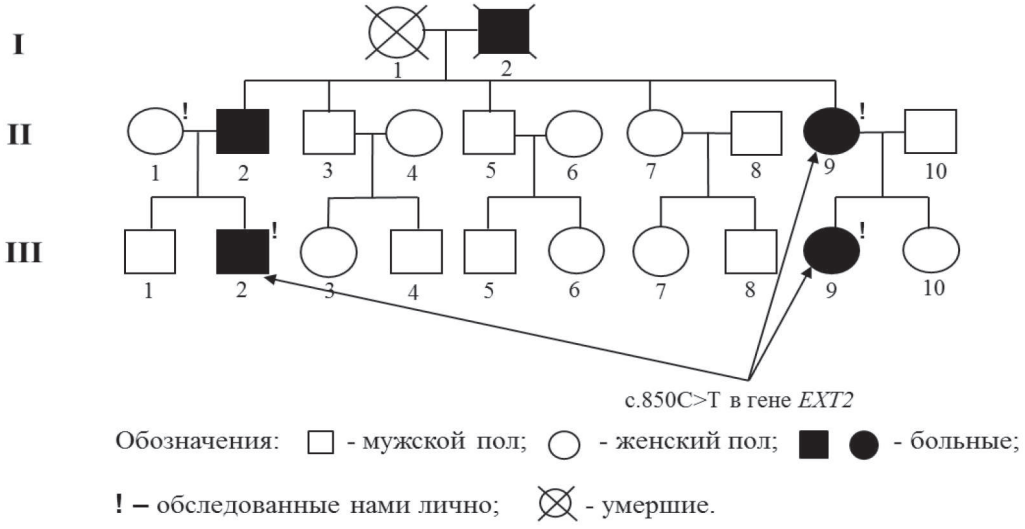
А.Е. Яковлева[1], Д.А. Петухова[1], А.Л. Данилова[1], П.И. Голикова[1], А.Л. Сухомясова[1, 2], Н.Р. Максимова[1]

[1] Северо-восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск
[2] Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины, г. Якутск

Множественная экзостозная хондродисплазия (МЭХД) – аутосомно-доминантное заболевание скелета с частотой 1 : 50 000, составляющее до 10% обращений в специализированные клиники и более чем в 70% представленное семейными случаями [1, 2]. МЭХД характеризуется наличием множественных хрящевых разрастаний в областях длинных трубчатых костей, представлена генерализованными формами поражения скелета с многочисленными прогрессирующими деформациями костей и суставов, укорочением и вторичными изменениями костей, вторичными изменениями в мышечной системе [3]. Одним из неблагоприятных течений данного заболевания является трансформация в злокачественную форму [4, 5]. Наиболее частым вариантом причины данного заболевания являются мутации в генах *EXT1* и *EXT2*, которые отвечают за 90% всех случаев МЭХД.

Проведено молекулярно-генетическое исследование с использованием технологии массового параллельного секвенирования (NGS), а также с применением метода прямого секвенирования по Сэнгеру в группе пациентов из одной семьи с клиническим диагнозом МЭХД из Республики Саха (Якутия) (рисунок). В результате таргетного секвенирования с использованием панели TruSight One Sequencing Panel (Illumina, США) у пациента была обнаружена новая нонсенс-мутация c.850C>T в гене *EXT2* в гетерозиготном состоянии, приводящая к замене аминокислоты в позиции белка (p.Gln284Ter, NP_000392.3). Данная мутация ранее не была зарегистрирована в базах «1000 геномов», ESP6500, ExAC. Алгоритмы предсказания патогенности расценивают данную мутацию как вероятно патогенную (SIFT, PolyPhen2, MutationTaster). Далее методом прямого секвенирования по Сэнгеру было установлено, что данная мутация присутствует у трех членов семьи с клиническими проявлениями МЭХД.

Настоящее исследование является первым сообщением о больных МЭХД с подтвержденным молекулярно-генетическим диагнозом в Республике Саха (Якутия), которое может быть полезно для ранней диагностики данного заболевания.



Родословная семьи

Литература

1. *Schmale G.A. Conrad E.U., Raskind W.H.* The natural history of hereditary multiple exostoses // J. Bone Joint Surg. Am. 1994. V. 76, № 7. P. 986–992.
2. *El-Sobky T.A., Samir S., Atiyya A.N. et al.* Current paediatric orthopaedic practice in hereditary multiple osteochondromas of the forearm: a systematic review // SICOT-J. 2018. V. 4. P. 10.
3. *Li Y., Wang J., Wang Z. et al.* A genotype-phenotype study of hereditary multiple exostoses in forty-six Chinese patients // BMC Med. Genetics. 2017. V. 18 (1). P. 126.
4. *Ishimaru D., Gotoh M., Takayama S. et al.* Large-scale mutational analysis in the *EXT1* and *EXT2* genes for Japanese patients with multiple osteochondromas // BMC Genet. 2016. V. 17. P. 52.
5. *Samuel A., Rodriguez J.A. Jr., Beaton-Comulada D. et al.* Total knee arthroplasty in patients with multiple hereditary exostoses // Arthroplasty Today. 2018. V. 4 (3). P. 325–329.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 3

Ахмадуллина Ю.Р. Исследование повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови методом микроядерного теста у жителей прибрежных сел р. Течи 4

Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Хитринская Е.Ю., Кучер А.Н. Вовлеченность полиморфных вариантов генов систем репарации ДНК в развитие многофакторных заболеваний 5

Баканова М.Л., Минина В.И., Савченко Я.А., Глушков А.Н., Соболева О.А. Роль межгенных взаимодействий в формировании хромосомных нарушений у больных аденокарциномой легкого 7

Баранова Е.Д., Головина Т.А., Мейер А.В., Минина В.И., Михайлова А.О., Тимофеева А.А., Шубенкина Д.П., Дружинин В.Г. Базовый уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах и буккальных эпителиоцитах больных раком легкого 8

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., Федотов Д.А., Дериглазов Д.А., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Клиническая и цитогенетическая характеристика пациентов с недифференцированной умственной отсталостью и хромосомными микродупликациями 9

Bernatowicz K., Zimowski J., Łaczmańska I., Piotrowski K., Bednarska-Makaruk M., Sąsiadek M., Gronwald J. Clinical utility of MLPA and QF-PCR techniques in the diagnosis of genetic cause of miscarriage 10

Васильев С.А., Савченко Р.Р., Скрябин Н.А., Лопаткина М.Е., Фишман В.С., Грибова О.В., Сухих Е.С., Лебедев И.Н. Эпигенетические компоненты нестабильности хромосом соматических клеток 11

Васильева О.Ю., Скрябин Н.А., Федотов Д.А., Зарубин А.А. Детекция мутаций при болезни Вильсона – Коновалова с помощью таргетного массового параллельного секвенирования 13

Возилова А.В., Ахмадуллина Ю.Р. Исследование индивидуальной радиочувствительности у человека на основе оценки частоты хромосомных аберраций и микроядер в Т-лимфоцитах периферической крови 14

Гайнер Т.А., Каримова О.Г., Хрестина С.В., Корень О.Л., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б., Черемных А.Д., Васильев С.А., Скрябин Н.А., Лопаткина М.Е., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Диагностика редких хромосомных аномалий 15

Голубенко М.В., Марков А.В., Зарубин А.А., Слепцов А.А., Салахов Р.Р., Тарасенко Н.В., Казанцев А.Н., Королёва Ю.А., Назаренко М.С., Барбараш О.Л., Пузырёв В.П. Эпигенетическое взаимодействие ядерного и митохондриального геномов при атеросклерозе 18

Гомбоева Д.Е., Сайк О.В., Брагина Е.Ю., Марков А.В., Иванисенко В.А., Назаренко М.С., Пузырёв В.П. Поиск генов дистропии болезни Гентингтона и онкологических заболеваний 19

Гончарова И.А., Назаренко М.С., Марков А.В., Тарасенко Н.В., Печерина Т.Б., Кашталап В.В., Понасенко А.В., Барбараш О.Л., Пузырёв В.П. Генетические особенности формирования коморбидности болезней сердечно-сосудистого континуума 20

Гридина М.М., Орлова П.А., Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Кораблев А.Н., Мензоров А.Г., Орищенко К.Е., Лебедев И.Н., Серов О.Л. Коррекция крупных хромосомных дупликаций в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека 22

Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Буслаев В.Ю., Волобаев В.П., Головина Т.А., Мацкова Л.В., Мейер А.В., Михайлова А.О., Шубенкина Д.П. Состав микробиоты верхних дыхательных путей человека и оценка его влияния на кластогенные и анеугенные эффекты в лимфоцитах крови и буккальных эпителиоцитах 23

Емельянов А.К., Лавринова А.О., Мельникова Н.В., Дмитриев А.А., Милюхина И.В., Пчелина С.Н. Эпигенетическая регуляция экспрессии гена альфа-синуклеина (SNCA) при болезни Паркинсона 23

Жигалина Д.И., Скрябин Н.А., Канбекова О.Р., Марошкина А.Н., Чуркин Е.О., Лебедев И.Н. Преимплантационное генетическое тестирование анеуплоидий методом aCGH 24

Зарубин А.А., Марков А.В., Шарыш Д.В., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырёв В.П., Назаренко М.С. МикроРНК miR-326: согласованность изменений метилирования ДНК и экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий 25

Иванова А.С., Гусева Л.В. Синдром Фелан – МакДермид 27

Исубакова Д.С., Халюзова М.В., Брониковская Е.В., Цымбал О.С., Тахауов Р.М., Карпов А.Б., Тахауова Л.Р., Литвяков Н.В. Влияние ионизирующего излучения на формирование цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови у работников Сибирского химического комбината 28

Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Плейотропные эффекты CNV в онтогенезе человека 29

Королёва Ю.А., Салахов Р.Р., Марков А.В., Шарыш Д.В., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Бурков Н.Н., Пузырёв В.П., Назаренко М.С. Вариабельность метилирования генов *MIR21* и *CARMN* (*MIR143HG*) при осложненном течении атеросклероза 31

Кривощапова Я.В. Изучение длины теломер в Т-лимфоцитах человека 32

Кучер А.Н. Экзогенные модификаторы функционирования генома 34

Лебедев И.Н. Онтогенетика и патогенетика хромосомных болезней 35

Лемская Н.А., Романенко С.А., Резакова М.В., Дольский А.А., Прокопов Д.Ю., Шорина А.Р., Максимова Ю.В. Хромосомные перестройки: фенотипические эффекты и значимость комплексного молекулярно-цитогенетического исследования 37

Лопаткина М.Е., Фишман В.С., Гридина М.М., Скрябин Н.А., Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Назаренко Л.П., Серов О.Л., Лебедев И.Н. Дифференциальная активность генов в нейронах с реципрокными хромосомными микроделециями и микродупликациями 37

Марков А.В., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырёв В.П., Назаренко М.С. Клеточная гетерогенность при анализе метилирования ДНК в пораженных атеросклерозом артериях 39

Маркова Ж.Г., Миньженкова М.Е., Тарлычева А.А., Шилова Н.В. Структурная гетерогенность малых сверхчисленных маркерных хромосом 40

Мейер А.В., Толочко Т.А., Минина В.И., Тимофеева А.А., Ларионов А.В. Комплексный подход к оценке генотоксичности производственных факторов угольных шахт Кемеровской области 41

Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Лопаткина М.Е., Черемных А.Д., Яковлева Ю.С., Лебедев И.Н. Клинический случай синдрома Паллистера – Киллиана с частичной трисомией 12p 43

Минина В.И., Баканова М.Л., Савченко Я.А., Тимофеева А.А., Рыжкова А.В., Глушков А.Н. Оценка хромосомной нестабильности у рабочих угольных шахт и угольных теплоэлектростанций 45

Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В. Этиопатогенез аномального фенотипа при *de novo* сбалансированных перестройках 46

Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Мензоров А.Г., Яковлева Ю.С., Васильев С.А., Лопаткина М.Е., Гридина М.М., Хабарова А.А., Распопова М.А., Пристяжнюк И.Е., Серов О.Л., Лебедев И.Н. Особенности динамического мозаицизма кольцевых хромосом человека в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках 47

Опарина Н.В., Калиненкова С.Г., Латыпов А.Ш., Черных В.Б. Гоносомный мозаицизм при синдроме Шерешевского – Тернера 48

Опарина Н.В., Коталевская Ю.Ю., Соловова О.А., Латыпов А.Ш., Калиненкова С.Г., Воскобоева Е.Ю. Редкий случай межтканевого мозаицизма при синдроме Дауна 50

Пантелеева А.А., Мирошникова В.В., Марков А.В., Назаренко М.С., Побожева И.А., Разгильдина Н.А., Беляева О.Д., Полякова Е.А., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н. Тканеспецифичное метилирование ДНК регуляторных областей генов *ABCA1* и *ABCG1* в жировой ткани при ишемической болезни сердца 51

Папанов С.И., Шабанова Ю.Л., Колбасин Л.Н., Урванцева И.А. Особенности пре- и постнатальной диагностики синдрома 49,XXXXY: описание клинического случая 52

Пушкарев В.П., Глазырина Е.А., Серебреникова Т.Е. Сравнение методов исследования генетической патологии эмбриона при неразвивающейся беременности: клинический случай 53

Савченко Р.Р., Васильев С.А., Фишман В.С., Мурашкина А.А., Лебедев И.Н. Влияние нокаута генов *ADAMTS1*, *THBS1* и *RBFOX2* на частоту хромосомных нарушений и радиационно-индуцированный ответ в опухолевых клетках 54

Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Эпигенетический статус импринтированных генов при нарушениях эмбрионального развития и привычном невынашивании беременности 55

Салахов Р.Р., Зарубин А.А., Павлюкова Е.Н., Канев А.Ф., Глотов О.С., Алавердян Д.А., Назаренко М.С., Голубенко М.В., Пузырёв В.П. Диагностика гипертрофической кардиомиопатии методом высокопроизводительного секвенирования 57

Скрябин Н.А., Васильев С.А., Никитина Т.В., Жигалина Д.И., Савченко Р.Р., Бабушкина Н.П., Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Регионы гомозиготности в экстраэмбриональных тканях спонтанных абортусов 58

Слепухина А.А., Новикова М.А., Лопаткина М.Е., Зубрицкий А.В., Лифшиц Г.И., Лебедев И.Н. Хромосомные микродупликации с неопределенной клинической значимостью у детей с врожденными пороками сердца 59

Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Чойнзонов Е.Л., Кондакова И.В., Тарасенко Н.В. Роль мутации BRAF-V600E в изменении экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, компонентов AKT/m-TOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы 61

Тарасенко Н.В., Бабушкина Н.П., Кашеварова А.А., Саприна Т.В., Милованова Т.А., Трубченко К.В., Лежнина О.В., Назаренко М.С. Случайная находка делеции региона, содержащего ген *PMP22*, при секвенировании клинического экзома 61

Тверленёва А.А., Юрченко Д.А., Шилова Н.В. Inv dup del 8p: насколько *de novo*? 63

Толмачёва Е.Н., Скрябин Н.А., Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Затула Л.А., Фонова Е.А., Лебедев И.Н. CNV и асимметричная инактивация X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности 64

Толстых Е.И., Дегтева М.О., Возилова А.В., Аклеев А.В. Интерпретация результатов метода FISH при неравномерном внутреннем облучении тела человека с использованием модельного подхода 65

Трофимова И.Л., Сайфитдинова А.Ф., Логинова Ю.А., Кинунен А.А., Тонян З.Н., Пастухова Ю.Р., Леонтьева О.А., Кузнецова Р.А., Чиряева О.Г., Глотов О.С., Полякова И.В., Щербак С.Г., Бичевая Н.К. Комплексный подход с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации и технологии секвенирования нового поколения в преимплантационной диагностике Y-аутосомных транслокаций 66

Чернова А.В., Севостьянова И.А., Никитина Н.В., Сумина М.Г., Гапич Т.А., Лагутина О.В. Клинико-цитогенетическая характеристика двух случаев изодицентрической хромосомы Y 67

Черных В.Б. Подходы к систематизации гоносомного мозаицизма 68

Шилова Н.В. Интерпретация клинически значимых CNV 69

Шкаврова Т.Г., Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Голуб Е.В., Даниленко А.А. Молекулярно-цитогенетические нарушения у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом с прогрессией заболевания 70

Яковлева А.Е., Петухова Д.А., Данилова А.Л., Голикова П.И., Сухомясова А.Л., Максимова Н.Р. Новая мутация в гене *EXT2* у больных с множественной экзостозной хондродисплазией в Якутии 72