

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

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

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

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

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

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

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

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

# Медицинская ГЕНЕТИКА

Ежемесячный рецензируемый научно-практический журнал

2018 г. Том 17. №2 (188)

## СОДЕРЖАНИЕ

### НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

#### *Черных В.Б.*

Геномные технологии в диагностике нарушений формирования пола, развития половой системы и репродукции человека.....3

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Дадали Е.Л., Шилова Н.В.*

Интерхромосомная и интрахромосомная инсерции с участием хромосомы 2.....12

#### *Баканова М.Л., Минина В.И., Тимофеева А.А., Головина Т.А., Савченко Я.А., Рыжкова А.В., Титов Р.А., Асанов М.А., Титов В.А., Вафин И.А.*

Цитогенетические нарушения у больных раком легкого: феномен rogue cells в клетках крови.....18

#### *Возилова А.В.*

Диагностика хронических лейкозов с применением методов молекулярной цитогенетики. Особенности методологии.....24

#### *Гараева А.Ф., Рудко А.А., Брагина Е.Ю., Бабушкина Н.П., Колоколова О.В., Липаенкова О.Н., Пузырев В.П., Фрейдин М.Б.*

Исследование генетической компоненты при разных клинических проявлениях туберкулеза.....29

#### *Сермягина И.Г., Баязутдинова Г.М., Браславская С.И., Логинова А.Н., Ряднинская Н.В., Чухрова А.Л., Щагина О.А., Поляков А.В.*

Молекулярные причины прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии у российских пациентов.....35

#### *Толмачёва Е.Н., Скрябин Н.А., Сеитова Г.Н., Суханова Н.Н., Черемных А.Д., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.*

Влияние инактивации X-хромосомы на фенотипические проявления транслокаций X;аутосома .....39

#### *Жигалина Д.И., Скрябин Н.А., Канбекова О.Р., Артюхова В.Г., Светлаков А.В., Лебедев И.Н.*

Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости бластоцисты человека .....46

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

Executive editor  
IZHEVSKAYA V.L.

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

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

# Medical GENETICS

Monthly reviewed scientific and practical journal

2018. Volume 17. №2 (188)

## Content

### REVIEWS

*Chernykh V.B.*

Genomic technologies in the diagnosis of disorders  
of sex differentiation, development of the reproductive system and human reproduction.....3

### ARTICLES

*Minzhenkova M.E., Markova Z.G., Dadali E.L., Shilova N.V.*

Interchromosomal and intrachromosomal insertions involving a chromosome 2 .....12

*Bakanova M.L., Minina V.I., Timofeva A.A.,  
Golovina T.A., Savchenko Ya.A., Ryzhkova A.V.,  
Titov R.A., Asanov M.A., Titov V.A., Vafin I.A.*

Cytogenetic damage in blood cells of lung cancer patients:  
rogue cell phenomenon .....18

*Vozilova A.V.*

Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemias  
by Means of Methods of Molecular Cytogenetics.  
Characteristics of the Methodology .....24

*Garaeva A.F., Rudlo A.A., Bragina E.Yu., Babushkina N.P.,  
Kolokolova O.V., Lipaenkova O.N., Puzyrev V.P., Freidin M.B.*

Studying the role of genetic component  
in development of different clinical forms of TB.....29

*Sermyagina I.G., Bayazutdinova G.M., Braslavskaya S.I.,  
Loginova A.N., Ryadninskaya N.V., Schagina O.A., Poliakov A.V.*

The molecular reasons for the Fibrodysplasia ossificans progressiva  
in the Russian patients.....35

*Tolmacheva E.N., Skryabin N.A., Seitova G.N., Sukhanova N.N.,  
Cheremnykh A.D., Nazarenko L.P., Lebedev I.N.*

Effect of X chromosome inactivation on phenotypic manifestations  
of translocations X;autosome .....39

*Zhigalina D.I., Skryabin N.A., Kanbekova O.R.,  
Artyukhova V.G., Svetlakov A.V., Lebedev I.N.*

Comparative cytogenetics  
of embryoblast, trophoctoderm and blastocoele fluid  
of human blastocyst .....46

## Геномные технологии в диагностике нарушений формирования пола, развития половой системы и репродукции человека

Черных В.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ, Москва  
e-mail: chernykh@med-gen.ru

Стремительное развитие геномных технологий, в первую очередь хромосомного микроматричного анализа (ХМА) и секвенирования нового поколения (NGS), привело к значительному расширению возможностей молекулярной диагностики различных мутаций/генетических вариантов. В последние годы начато использование новых методов анализа генома в различных областях медицинской генетики, в том числе при обследовании пациентов с нарушениями формирования пола, развития половой системы, репродуктивной функции, для исследования abortивного материала самопроизвольно прервавшихся беременностей, а также в преимплантационной генетической диагностике. Представленный обзор посвящен результатам геномных исследований в репродуктивной генетике и их место в медико-генетическом обследовании пациентов с нарушением репродукции.

**Ключевые слова:** хромосомный микроматричный анализ, секвенирование нового поколения, вариации числа копий, генные мутации/варианты, нарушение формирования пола, бесплодие, невынашивание беременности.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

### Genomic technologies in the diagnosis of disorders of sex differentiation, development of the reproductive system and human reproduction

Chernykh V.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical genetics, Moscow

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow  
e-mail: chernykh@med-gen.ru

The rapid development of genomic technologies, especially chromosomal microarray analysis and new-generation sequencing, has led to significant opportunities for the molecular diagnosis of various mutations/genetic variants. In recent years, there is initiated the widespread using of new methods of genome analysis in various topics of medical genetics, including the evaluation of patients with disorders of sex differentiation, abnormal development of the reproductive system, failures of reproductive function, studies of abortion material of spontaneous interrupted pregnancies, as well as in preimplantation genetic diagnosis. The presented review covers the results of genome research in reproductive genetics and their place in genetic evaluation of patients with reproductive disorders.

**Key words:** chromosomal microarray analysis (CMA), next-generation sequencing (NGS), copy number variation (CNV), gene mutations/variants, disorders of sexual differentiation (DSD) and development, infertility, pregnancy loss.

#### Введение

Генетические нарушения являются основными причинами аномалий формирования пола и развития половой системы, тяжелых форм бесплодия у мужчин и женщин, а также большинства случаев репродуктивных потерь. Кроме того, описано большое количество генетических факторов ассоциированы (связаны) с различными нарушениями развития или функции репродуктивной системы у человека. Их наличие может предрасполагать к снижению фертильности, бесплодию, невынашиванию беременности. Нарушения развития и функции органов репродуктивной системы отмечены у пациентов с различными наследственными заболеваниями и генетическими синдромами [1].

Актуальность генетического обследования пациентов с нарушениями репродуктивной сферы несомненна в связи с высокой частотой бесплодия и потерь бере-

менности (до 15–20%). Несмотря на значимую роль генетических и эпигенетических факторов в репродукции человека, генетическая диагностика причин аномалий полового развития, бесплодия, невынашивания беременности остается недостаточно эффективной в связи с крайне высокой этиологической гетерогенностью нарушений репродуктивной системы [1–7].

Причинами и факторами нарушений развития и функции репродуктивной системы являются различные генетические и эпигенетические изменения у пациентов, в их половых клетках и/или в формирующихся эмбрионах [1–13]. Степень влияния этих изменений на репродуктивную систему и фертильность зависит от типа мутации/изменения генома, а также их происхождения, количества клеток, несущих изменения (в случае мозаицизма и химеризма), генетического фона, действия средовых и других факторов. Генетическими факторами

нарушения репродукции могут быть как герминативные, так и постзиготические, мозаичные мутации; они могут затрагивать различные уровни генома: геномный или хромосомный (числовые и структурные мутации хромосом, микроструктурные перестройки, вариации числа копий — CNV, copy number variation), генный (различные типы генных мутаций/вариантов), эпигенетические изменения (аномалии инактивации X-хромосомы и геномного импринтинга, «незрелый хроматин» в сперматозоидах, изменение состава некодирующих РНК в гаметах/эмбрионе). Мутации могут затрагивать как половые хромосомы, так и аутосомы, а также митохондриальный геном. Аномалии/мутации половых хромосом занимают ведущее место в структуре генетически обусловленных форм патологии репродуктивной системы и связаны с гоносомными синдромами и другими синдромальными, а также несиндромальными нарушениями репродукции человека [1–3, 5].

Для многих генетически обусловленных аномалий развития и нарушений функции репродуктивной системы характерна первичность нарушения фертильности (первичное бесплодие). В частности, первичное бесплодие, неподдающееся лечению, характерно для нарушений дифференцировки пола, таких, как дисгенезия гонад, овотестикулярная и 46,XX-тестикулярная формы нарушений формирования пола (НФП), тяжелых форм нарушения гаметогенеза и гипогонадизма (секреторной азооспермии, синдрома преждевременной недостаточности яичников, СПНЯ). Стойкое первичное бесплодие, неподдающееся консервативному лечению, а в ряде случаев не преодолевается и методами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО, ICSI), может быть обусловлено нарушением дифференцировки гонад, тяжелыми формами поражения гаметогенеза, морфологическими/ультраморфологическими аномалиями мужских и женских гамет [6]. Однако при ряде генетических нарушений репродукции возможно, как первичное, так и вторичное бесплодие, невынашивание беременности и/или снижение фертильности (например, у носителей робертсоновских и реципрокных транслокаций, некоторых инверсий, сверхчисленных маркерных хромосом).

Молекулярно-генетическая диагностика наиболее успешна для синдромальных форм нарушений репродукции, обусловленных генными мутациями, особенно моногенных, дигенных или олигогенных нарушений формирования пола и развития половой системы вследствие дефектов продукции, метаболизма или действия гонадотропных и половых гормонов, антимюллерова гормона (например, дефицит 21-гидроксилазы, синдром тестикулярной феминизации, синдром персистенции мюллерова протока, муковисцидоз, синдром СВАВД). Несиндромальные генетические нарушения фертильности, связанные с генными мутациями и CNV, в большинстве случаев остаются неустановленными из-за отсутствия или слабой представленности мажорных мутаций в их генетической структуре. Исследование мута-

ций/генетических вариантов отдельных генов и генных панелей в клинически неотобранных группах пациентов с нарушением фертильности (бесплодием или невынашиванием беременности) неэффективно. Вследствие выраженной генетической гетерогенности значительное количество мутаций не удается выявить при «стандартном» медико-генетическом обследовании, поэтому их диагностика требует использования комплексного генетического обследования, в том числе полногеномного анализа [5]. Последний может быть выполнен после стандартного (рутинного) генетического обследования (например, пациентов с дисгенезией гонад, овотестикулярным НФП, мужчин с бесплодием и патозооспермией, пациенток с аменореей), либо рекомендован как исследование первой линии при подозрении на гетерогенные нарушения репродукции, вызванные генными мутациями (например, синдромальные формы аномалий гамет, синдром первичной цилиарной дискинезии).

#### **Современные молекулярные технологии анализа генома: от научных исследований к генетической диагностике**

Стремительное развитие молекулярных технологий исследования генома, их широкое внедрение в медицинскую генетику значительно расширили возможности цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики. Различные методы анализа генома, транскриптома, РНК-ома, эпигенома все чаще используют не только с научно-исследовательской целью, но и в клинической практике, в диагностике различных наследственных заболеваний, генетических и эпигенетических нарушений. Использование хромосомного микроматричного анализа (ХМА) — сравнительной геномной гибридизации на чипах (Chromosomal Microarray Analysis, array CGH, Comparative Genomic Hybridization), технологий секвенирования ДНК нового поколения (NGS, Next Generation Sequencing), типирование однонуклеотидных полиморфных вариантов (single nucleotide polymorphism/variant, SNP/SNV), анализа метилома и других полногеномных или широкогеномных методов исследований в значительной мере повысило эффективность детекции анеуплоидий/анеусомий, несбалансированных структурных перестроек (микроделетций, микродупликаций, инсерций, хромотрипсиса), различных генных мутаций/вариантов, поиска кандидатных генов, однородительских дисомий (ОРД), потери гетерозиготности, эпигенетических нарушений.

Поскольку большинство наследственных заболеваний вызвано генными мутациями, анализ кодирующих последовательностей генома (экзома) достаточен для определения подавляющего большинства патогенных мутаций. С 2007 года начато применение массового параллельного секвенирования ДНК для детекции мутаций, вызывающих редкие наследственные заболевания, для скрининга анеуплоидий в преимплантационной (ПГД) и пренатальной генетической диагностике [9].

В последние несколько лет методы геномного анализа все шире используются в исследованиях и диагностике нарушений развития и функции репродуктивной системы, репродукции человека [5] для генетического обследования пациентов с аномалиями формирования пола, развития половой системы, гипогонадизмом, нарушением гаметогенеза и репродуктивной функции (бесплодием, привычным невынашиванием беременности), исследования материала самопроизвольно прервавшихся беременностей — спонтанных выкидышей, замерших беременностей, анэмбрионии и других аномалий развития эмбриона/плода, а также при проведении ПГД и пренатальной генетической диагностики [7, 10—27].

### Геномные технологии в диагностике нарушений формирования пола и развития половой системы

Дефекты развития половой системы у человека часто приводят к нарушениям репродуктивной функции, снижению или полному отсутствию фертильности (стерильности). Аномалии половой дифференцировки, НФП представляют собой обширную гетерогенную группу врожденных заболеваний/пороков, сопровождающихся аномалиями формирования пола и развития половой системы, которые могут затрагивать генетический (хромосомный), гонадный, анатомический и/или гормональный уровень пола, половую аутоидентификацию [28]. Для них характерны выраженный полиморфизм фенотипов и генетическая гетерогенность, большое количество клинических форм НФП, поэтому для многих из них генетическая диагностика без выполнения дополнительных генетических исследований имеет недостаточную эффективность [18]. В целом успешность обнаружения причин НФП не превышает 15%, при этом большинство из диагностированных мутаций представляют собой мутации половых хромосом [7, 28].

Частота встречаемости аномалий строения половых органов составляет в среднем 5 на 1000 новорожденных. У 3—4% новорожденных мальчиков отмечают крипторхизм, у 75% пациентов с неправильным строением половых органов — гипоспадию [1]. Около 80% детей с атипичным строением гениталий имеют нормальный мужской кариотип (46,XY), у 10—15% пациентов выявляют нормальный женский кариотип (46,XX), у остальных — хромосомные аномалии, представленные преимущественно мутациями половых хромосом (гоносом) в регулярной или мозаичной форме [1—3]. Согласно международному Консенсусу предложено классифицировать все аномалии пола на гоносомные НФП (обусловленные мутациями половых хромосом), 46,XX НФП и 46,XY НФП [28]. Более 90% случаев 46,XX НФП вызвано избыточной продукцией андрогенов вследствие недостаточной активности 21-гидроксилазы, приводящей к врожденной дисфункции (гипертрофии) коры надпочечников (ВДКН, congenital adrenal hyperplasia,

САН). Частота данного аутосомно-рецессивного НФП составляет 1 на 10000—14000 новорожденных. В отличие от группы 46,XX НФП, структура группы 46,XY НФП более сложна, не имеет столь выраженных «мажорных» форм и часто обусловлена аномалиями дифференцировки гонад, нарушением продукции или действия половых или гонадотропных гормонов [7, 28].

Выполнение стандартного цитогенетического исследования (анализа кариотипа в лимфоцитах периферической крови) в большинстве случаев позволяет определить группу НФП у пациентов с аномалиями пола. По необходимости, например, при уточнении/верификации гоносомного мозаицизма, хромосомных перестроек, он может быть дополнен FISH или ПЦР-анализом половых хромосом. При аномалиях формирования пола, связанных с несоответствием кариотипа фенотипу, в частности при XY-дисгенезии гонад, овотестикулярной и 46,XX-тестикулярной форме НФП, вторым этапом генетического исследования часто является анализ гена *SRY* (*Sex-determining Region Y*), реже — других генов, вовлеченных в дифференцировку пола (*SOX9*, *NR5A1*, *NROB1*, *AR* и др.). Однако в 65—70% случаев НФП и аномалий развития половой системы, не вызванных мутациями гоносом, рутинное генетическое обследование не позволяет выявить их причину [7].

С начала 2000-х годов начато использование анализа панелей генов, вовлеченных в дифференцировку пола и в контроль полового развития при медико-генетическом обследовании пациентов с НФП с использованием общепринятых молекулярно-генетических методов (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру), а в последние годы — методом NGS, при необходимости дополняя их мультиплексной лигазной амплификацией (MLPA) или ХМА (aCGH) [18, 18, 19, 29—31]. Проведение полноэкзомного или полногеномного анализа позволяет повысить результативность (эффективность) генетической диагностики НФП в целом на 25—40%, то есть не менее чем в 2—3 раза [19, 29—31]. В наиболее крупном из опубликованных геномных исследований обследовано 326 пациентов (278 больных — с 46,XY НФП и 48 пациентов — с 46,XX НФП) [31]. Авторами проведен анализ панели из 64 генов с известной ролью в возникновении нарушений формирования пола и дополнительно 967 кандидатных генов, отобранных по результатам биоинформатического анализа. В группах с 46,XY НФП и 46,XX НФП генетические причины выявлены у 43% и 17% пациентов соответственно. Наиболее высокий процент выявляемости мутации был у 46,XY пациентов с НФП вследствие дефицита продукции или действия андрогенов [31].

Методы геномного анализа успешно используют для выявления генетических нарушений полового созревания, гипогонадотропного гипогонадизма. При секвенировании панели из 261 гена, вовлеченного в гипоталамический, гипофизарный и/или обонятельный пути, идентифицированы две новые мутации гена *FGFR1*, определены 18 новых кандидатных генов, связанных

с развитием гипогонадотропного гипогонадизма и синдрома Кальмана: *AMNI, CCKBR, CRY1, CXCR4, FGF13, GAP43, GLI3, JAG1, MASTL, NOS1, NOTCH1, NRP2, PALM2, PDE3A, PLEKHA5, RD3, TRAPPC9* и *TSPAN11* [32]. В них обнаружены различные мутации/варианты последовательности ДНК, классифицированные как патогенные или вероятно патогенные. У некоторых пациентов выявлены 'дигенные' варианты с наличием мутаций в двух различных генах.

### Геномные технологии в диагностике бесплодия и невынашивания беременности

Нарушения репродукции представляют собой огромную, чрезвычайно гетерогенную по этиологии, патогенезу, фенотипическим проявлениям, группе заболеваний и состояний, связанных с проблемами деторождения (бесплодие, невынашивание, патология беременности), с нарушением фертильности у одного или обоих супругов. Генетические факторы могут играть ведущую роль в их этиологии (генетически обусловленные формы бесплодия, невынашивания или снижения фертильности), либо составлять генетический фон, предрасполагающий к их развитию (многофакторные нарушения репродукции). Результаты использования новых молекулярных методов исследования генома в изучении нарушений репродукции у мужчин, в том числе изменений копий генов Y-хромосомы, приведены в недавнем обзоре литературы [5].

Одними из наиболее исследованных микроструктурных вариантов генома при бесплодии являются несбалансированные перестройки половых хромосом (X и Y, CNV при этом, как правило, возникают вследствие микроделений и микродупликаций. В целом, микроделеции чаще, чем дупликации оказывают негативное влияние на сперматогенез и мужскую фертильность. Самыми частыми из них являются микроделеции длинного плеча Y-хромосомы в локусе Yq11.21-q23 [5, 33–35]. Они приводят к утрате одного, двух или всех трех регионов AZF (azoospermia factor, «фактора азооспермии»: AZFa, AZFb, AZFc), содержащих большинство Y-сцепленных генов, контролирующих сперматогенез. Полные делеции, целиком удаляющие 1–3 региона AZF, приводят к выраженному угнетению сперматогенеза, вплоть до секреторной азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени [33]. Неполные AZF-делеции, как правило, частично затрагивающие AZFc и/или AZFb регионы, характеризуются вариабельностью состояния сперматогенеза и показателей спермограммы у их носителей (от нормозооспермии, олигозооспермии различной степени, астено-/тератозооспермии и азооспермии), что обусловлено потерей части копий генов (*DAZ, CDY1, VCY, RBMY* и других) регионов AZFb и/или AZFc [5, 33–35].

Совсем недавно проведено исследование гена *RBMY1* (из региона AZFb) и показателей спермограммы

у 564 мужчин с патозооспермией (с олигозооспермией,  $n = 72$ , с астенозооспермией,  $n = 144$ , с олигоастенозооспермией,  $n = 348$ ), 506 — с нормозооспермией и 486 фертильных мужчин [36]. У 59,5% обследованных мужчин выявлено наличие 6 копий гена *RBMY1*, у остальных — меньшее ( $n = 2–5$ , 18,5% мужчин) или большее ( $n = 7–10$ , 22% мужчин) их количество. Показано, что число копий гена *RBMY1* прямо коррелирует с подвижностью сперматозоидов. У мужчин, имеющих от 2 до 5 его копий, чаще отмечена сниженная подвижность сперматозоидов (астенозооспермия) по сравнению с мужчинами, имеющими 6 копий гена и более [36].

Помимо микроделений эухроматиновой области длинного плеча Y-хромосомы, а также вариации числа мультикопийных X- и Y-сцепленных генов, имеющих тестис-специфичную экспрессию и вовлеченных в контроль спермато- и спермиогенеза (*TSPY, DAZ, CDY, RBMY1, VCY/VCY*), частыми микроструктурными перестройками гоносом, которые связаны с нарушением гаметогенеза и бесплодием, являются CNV хромосом X и Y (микроделеции и микродупликации), располагающиеся в псевдоаутосомных (*PAR, pseudoautosomal region*) областях, преимущественно в *PAR1* [37–39]. Их наличие может изменить копийность и активность располагающихся в них или поблизости генов, нарушить прохождение мейоза, конъюгацию и рекомбинацию хромосом, приводя к выраженному нарушению сперматогенеза, вплоть до секреторной (необструктивной) азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени.

В целом, частота встречаемости генетических нарушений репродукции у пациентов с патологией половой системы напрямую зависит от ее тяжести, поэтому генетическая диагностика наиболее эффективна при НФП, тяжелых формах бесплодия, выраженном нарушении сперматогенеза (синдром «только клетки Сертоли», блок сперматогенеза) и оогенеза (СПНЯ), генетически обусловленных дефектах гамет (глобулозооспермия, «синдром неподвижных ресничек», отсутствие или гипоплазия прозрачной оболочки ооцита и др.). Гемизиготные мутации X-сцепленного гена (*TEX11*) обнаружены у мужчин с блоком сперматогенеза в профазе I мейоза [40]. При анализе панели из 25 генов, связанных со сперматогенезом, у 13 из 40 (32,5%) пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией обнаружены патогенные или возможно патогенные генетические варианты и/или CNV, в том числе мутация X-сцепленного гена *TEX11* (с.А511G, Met171Val) и три CNV (Yq11.222-223, Xp22.12, Xq24) в гемизиготном состоянии, остальные варианты (SNP и CNV) — в гетерозиготном состоянии [24]. У двух из 13 пациентов обнаружена мутация с.346-1G>A гена *SOHLH1*, который, как показано ранее, у мужчин вызывает необструктивную форму азооспермии, а у женщин — дефекты развития фолликулов и созревания ооцитов [41]. В итоге у 5 из 40 (12,5%) пациентов выявлены патогенные мутации, у 8 — возможно патогенные варианты [24].

Генетические причины, связанные не с хромосомными и частыми генными нарушениями репродукции у женщин, изучены в меньшей степени, чем у мужчин. В значительной мере это обусловлено трудностями получения женских половых клеток для исследования оогенеза и фолликулогенеза у человека [42]. Изучение биологических, эндокринных и генетических аспектов овариогенеза, фолликулогенеза, созревания ооцитов выявило сложность и «уязвимость» этих процессов, для действия различных негативных факторов, значительную гетерогенность этиологии и патогенеза, в том числе многообразии генетически обусловленных нарушений. Для многих пациенток с нарушением репродуктивной функции характерен сниженный овариальный резерв [42].

Одной из тяжелых форм женского бесплодия является СПНЯ. Данное этиологически гетерогенное нарушение оогенеза характеризуется преждевременным наступлением менопаузы (ранее 40 лет), аменореей, сопровождающейся повышенным уровнем ФСГ (более 40 МЕ/л), и встречается у 1% женщин репродуктивного возраста. Генетическими факторами развития СПНЯ являются структурные аномалии половых хромосом (преимущественно X-хромосомы), гоносомный мозаицизм (в том числе скрытый и гонадный), а также мутации и изменение числа копий аутомсомных и X-сцепленных генов, контролирующих оварио- и фолликулогенез, созревание ооцитов. Описано около 50 мутаций в 9 кандидатных генах (*FSHR*, *LHCGR*, *NR5A1*, *NOBOX*, *FOXL2*, *FIGLA*, *BMP15*, *NANOS3* и *STAG3*), связанных с развитием СПНЯ [43, 44].

У 20 из 42 (47,6%) 46,XX пациенток с СПНЯ, обследованных методом ХМА, обнаружены 15 различных CNV на X-хромосоме, из них 8 являлись дупликациями, 14 — делециями [45]. Некоторые обнаруженные CNV располагались в полиморфных локусах, другие — в описанных ранее регионах и генах X-хромосомы: *PCDH19* (Xq13.3), *POF1B* (Xq21), *CENPI* (Xq22.1), *XNPEP2*,

*UTP14A* (Xq25). При анализе экспрессии кандидатных генов, связанных с развитием СПНЯ (*AIFM*, *BCORL1*, *XNPEP2*, *ZFX*, *RBMX2*, *USP9X*, *USP27X*, *UTP14A*, *CENPI*), выявлена пониженная их экспрессия у носительниц соответствующих CNV [45].

Исследование другой выборки из 60 пациенток с СПНЯ методом ХМА позволило обнаружить 263 CNV (146 делеций и 117 дупликаций) размером от 20 т.п.н. до 3,6 млн п.н. [46]. После исключения 244 CNV, описанных в базе DGV (the Database of Genomic Variants <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), 19 CNV определены как значимые, их частота составила 7,2%. Выявленные кандидатные аутомсомные локусы и гены для СПНЯ приведены в таблице.

Поскольку в структуре генетически обусловленного СПНЯ не выявлено мажорного гена или мутации, выполнение секвенирования широкой панели генов или экзона/генома позволяет существенно повысить результативность поиска мутаций. Fonseca с соавторами выполнили секвенирование кодирующих областей 70 кандидатных генов, связанных с развитием СПНЯ [43]. Обследовано 12 пациенток с несиндромальной формой СПНЯ неясного генеза, имевших нормальный женский кариотип (46,XX). Контрольную группу составила 521 здоровая женщина, в том числе 176 женщин с менопаузой после 50 лет. У 3 из 12 пациенток выявлены патогенные или возможно патогенные мутации. Идентифицированы варианты в двух генах *ADAMTS19* (с.2828C/T, Thr943Ile) и *BMPR2* (с.2960C/T, Ser987Phe), вероятно, вызывающие СПНЯ, а также мутации гена *LHCGR* (с.296A/G, Ser176Pro), который, как ранее было показано, связан с развитием данного заболевания, а также со «слабым» ответом фолликулов на гормональную стимуляцию суперовуляции.

Lee с соавторами методом NGS провели анализ 83 генов, связанных с СПНЯ или с нарушением дифференцировки пола у 37 пациенток с аменореей [47]. У двух (5,4%) пациенток обнаружено наличие последо-

Таблица

Кандидатные аутомсомные локусы и гены для СПНЯ (по Jaillard с соавторами [46] с модификацией)

Локус	Тип CNV	Положение на хромосоме (согласно сборке генома человека hg19)	Размер	Ген
1p13.31	Делеция	109.697.100-109.745.781	49 т.п.н.	<i>KIAA1324</i>
2q14.2q14.3	Дупликация	122.121.531-122.863.325	742 т.п.н.	<i>CLASP1</i>
2p23.3	Дупликация	26.557.453-27.116.447	559 т.п.н.	<i>CENP A</i>
5p14.3	Дупликация	Нет данных	968 т.п.н.	<i>DNAH5</i>
8p23.2	дупликация	2.308.926-5.935.998	3627 т.п.н.	<i>CSMD1</i>
9p13.3	Дупликация	34.206.594-34.391.999	185 т.п.н.	<i>KIF24</i>
10q26.31	Дупликация	135.254.039-135.377.532	123 т.п.н.	<i>SYCE1</i>
13q34	Дупликация	114.931.625-115.043.128	112 т.п.н.	<i>CDC16</i>
15q21.1	Дупликация	48.057.293-48.145.309	88 т.п.н.	<i>SEMA6D</i>
21q22.3	Делеция	43.762.549-43.985.429	223 т.п.н.	<i>RSPH1</i>

вательностей четырех Y-сцепленных генов (*SRY*, *TBL1Y*, *DDX3Y* и *RPS4Y2*), подтвержденное мультиплексной ПЦР-амплификацией и секвенированием по Сэнгеру. У 8 (21,6%) пациенток выявлены мутации: не описанная ранее нонсенс-мутация в гене *AR/HUMARA* и миссенс-мутации в генах *HSD17B4*, *DNAH5* и *WRN* [47].

Генетические факторы играют значимую роль не только в этиологии генетически обусловленных, но и многофакторных заболеваний репродуктивной системы, оказывают влияние на репаративные процессы, сохранение и восстановление фертильности при воздействии негативных средовых факторов. Одним из распространенных гинекологических заболеваний, часто сопровождающих нарушение репродуктивной функции, является эндометриоз. В его патогенез вовлечены различные гены и системы: метаболизм стероидных гормонов, иммунные, про-, противовоспалительные и ростовые факторы, рецепторная активность, клеточная адгезия, ангиогенез и другие биологические процессы [13]. Многочисленными исследованиями показана генетическая предрасположенность к развитию эндометриоза у носительниц определенных аллелей и генотипов, однако комплексные, геномные исследования свидетельствуют о значительно более сложном патогенезе эндометриоза и роли в нем генетических факторов, чем предполагали ранее. Не выявлены конкретные гены или мутации, которые вызывали эндометриоз, но отмечаемое при нем нарушение экспрессии различных кандидатных генов может быть вызвано изменением на генетическом (соматические мутации, мозаицизм, хромотрипсис) и эпигенетическом уровне (изменение метилирования ДНК, гетерохроматизация, изменение регуляторных микроРНК) [13]. Поэтому комплексные исследования генома на различных уровнях (хромосомном, геномном и эпигенетическом) в различных типах клеток, органах и тканях являются перспективными в изучении природы как генетических, так и многофакторных заболеваний репродуктивной системы.

### Геномные технологии

#### в преимплантационной и пренатальной диагностике

Хромосомные мутации являются основной причиной нарушений развития эмбриона и потерь беременности, и встречаются в 50–60% всех случаев прерывания клинически зафиксированных беременностей у человека [4, 8, 9], поэтому актуальность выполнения генетических исследований в установлении причин бесплодия, невынашивания беременности (спонтанных аборт, замерших беременностей, анэмбрионии) не ослабевает. Молекулярные методы анализа генома (ХМА/aCGH, NGS, SNP-типирование, полногеномная амплификация, анализ метилома и др.) нашли широкое применение и успешно используются в ПГД, в инвазивной пренатальной генетической диагностике, а также в неинвазивной пренатальной диагностике (NIPT) [14–17, 22,

48, 49]. Новым направлением в ПГД (в качестве альтернативы исследования клеток трофобластической оболочки) является анализ внеклеточной ДНК эмбриона, полученной из жидкости бластоцисты — «неинвазивная» ПГД [14, 15]. Детекция полных и сегментных анеуплоидий по всем хромосомам — преимплантационный генетический скрининг (ПГС) позволяет улучшить генетический отбор эмбрионов в программах ЭКО/ICSI, увеличить частоту имплантации, наступления и сохранения беременности, что особенно актуально у носителей аномалий кариотипа, для супружеских пар позднего репродуктивного возраста.

Геномные исследования позволяют проводить поиск CNV и кандидатных генов, ответственных за самопроизвольное прерывание беременности, изучать эпигенетику нормального и патологического развития эмбриона/плода. Результаты данных исследований свидетельствуют о повышенной частоте аномалий импринтинга и нарушений эпигенетических модификаций в гаметах пациентов с нарушением фертильности, в аномально развивающихся эмбрионах и самопроизвольно прерванных беременностях [4, 10–12]. Предполагают, что до 40% случаев самопроизвольных прерываний беременности может быть связано с генными мутациями, влияющими на морфогенез и жизнеспособность плода, патогенными CNV и эпигенетическими нарушениями у эуплоидных эмбрионов, а также различными генетическими факторами, предрасполагающими к снижению фертильности и повышению риска невынашивания со стороны женского организма [9–11, 17, 20–23, 25–27].

Chen с соавторами исследовали биологический материал (биоптаты ворсин хориона, пуповинная кровь) от 2186 самопроизвольно прервавшихся беременностей методами высокоразрешающего ХМА (n = 376) и полногеномного (WGS) секвенирования (n = 1810) [49]. В 45% образцов обнаружены CNV, в том числе в 776 образцах продуктов зачатия естественным путем и в 41 образце — после ЭКО. Из них в 26,5% случаев отмечено самопроизвольное прерывание беременности в I триместре, в 35,6% случаев — во II триместре и в 37,9% случаев — в III триместре. CNV обнаружены в 817 (45%) образцах, исследованных методом WGS, и в 112 из 376 (30%) образцов, исследованных ХМА, комбинированно — в 929 (42,5%) всех исследованных образцов. Среди обнаруженных CNV в 47,3% случаях диагностированы трисомии аутосом, в 10,1% — мозаицизм по аутосомам, моносомия X — 9,9%, в 8,9% — полиплоидия. В целом выявлено 130 CNV в группе образцов, исследованных методом WGS, и 24 — в группе образцов, исследованных ХМА. Большинство из обнаруженных вариантов являлись перестройками *de novo*, и находились в гетерозиготном состоянии, наиболее часто в хромосомах 22 и 18, реже — в хромосомах X и 8. Размер выявленных делеций был существенно меньшим, чем дупликаций, в среднем составляя 7,64 млн п.н. (10,72–18,58 млн п.н.) для делеций и 22,67 млн п.н. (23,41–41,49 млн п.н.) для дупликаций.



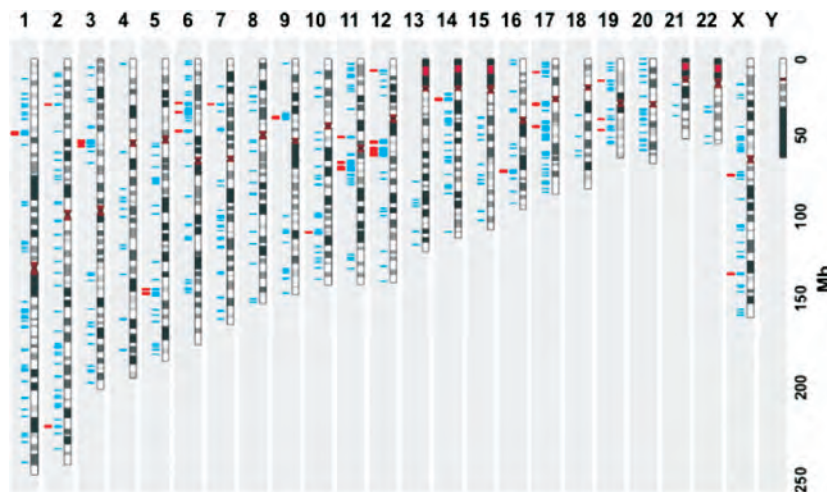
дупликаций. При этом их размер был значимо больше, чем размер CNV, обнаруживаемых у здоровых индивидумов, большинство из которых составляют менее 1 млн п.н. Выявлена некоторая зависимость количества случаев невынашивания беременности от типа анеуплоидии. Так, число потерь беременности прямо связано с частотой встречаемости полиплоидии и обратно — анеуплоидии по гомосомам. Частота делеций и дупликаций не коррелировала с количеством самопроизвольно прерванных беременностей. Хотя более крупные делеции обнаружены у женщин с неоднократными случаями невынашивания, различия не достигли уровня статистической значимости. При биоинформатическом анализе 154 обнаруженных CNV выделены 275 генов, мутации которых могут быть связаны с прерыванием беременности. При мутациях в 206 из них описаны аномалии эмбрионального развития, нарушение функции 84 из 206 генов может приводить к внутриутробной гибели у млекопитающих [49]. Расположение данных генов на хромосомах человека имеет кластерный характер, при этом 66 генов располагаются в 31 локусе различных аутосом (рисунок). Значительная часть выявленных кандидатных генов кодирует транскрипционные факторы, содержащие гомеодомен (*HOX*, *NKX*), домен «завиток-петля-завиток» bHLH (*HAND2*, *NEUROG2* и *NEUROD1*) или протеин-киназный домен.

Компаунд-гетерозиготные мутации генов *DYNC2H1* и *ALOX15* обнаружены в двух семьях с привычным невынашиванием беременности [23]. Ген *DYNC2H1* вовлечен в формирование ресничек, и его мутации связаны с внутриутробной гибелью эмбриона. Ген *ALOX15* экспрессируется в плаценте и нарушение его регуляции связано с воспалением, оксидативным стрессом, нарушением ангиогенеза и функции плаценты [23]. Определенные однонуклеотидные варианты (SNV) и мелкие инсерции и делеции (indel), обнаруженные у пациентов

с привычным невынашиванием беременности, с повышенной (по сравнению со здоровыми женщинами) частотой встречаются в локусах, содержащих гены, вовлеченные в контроль системы комплемента, свертывающей и противосвертывающей систем крови, а также в патогенез цилиопатий [50].

### Заключение

Результаты анализа генома человека наглядно свидетельствуют о том, что новые молекулярные методы и технологии могут быть успешно применены как с научно-исследовательской целью, так и для диагностики различных генетических и эпигенетических нарушений. Проведение полногеномного или полноэкзомного анализа в медико-генетическом обследовании пациентов с НФП, бесплодием, привычным невынашиванием беременности существенно повышает эффективность выявления генетических причин нарушений репродукции человека, успешность дифференциальной диагностики, медико-генетического консультирования, прогноза, облегчает выбор лечения, решения вопроса о преодолении проблем деторождения. Необходимо более широкое использование новых молекулярных методов в репродуктивной генетике, рациональное их сочетание с стандартными (рутинными) методами исследования, однако следует учитывать низкую эффективность полногеномного/экзомного анализа в неотобранных группах пациентов с нарушением репродукции. Системный подход в исследовании различных мутаций/вариаций генома, их сочетаний и связи с фенотипическими проявлениями на различных уровнях организма (органном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном) необходим для комплексной оценки их значимости в нарушении репродуктивной системы и фертильности.



Локализация 712 генов, связанных с развитием эмбриона (указаны голубым цветом) и их кластеров (указаны красным цветом), содержащих  $\geq 4$  гена, связанных с морфогенезом, на хромосомах человека (номера хромосом 1–22 указаны сверху, X и Y — половые хромосомы), справа шкала размера хромосом в млн п.н. (по Chen с соавторами [49]).

Список литературы

1. Курило Л.Ф., Андреева М.В., Коломиец О.В., Сорокина Т.М., Черных В.Б. и др. Генетические синдромы с нарушениями развития органов половой системы // Андрология и генитальная хирургия. 2013. Т. 14. №4. С. 17-27.
2. Курило Л.Ф. Аномалии развития половой системы вследствие генных мутаций // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. Т. 10. № 2. С. 58-65.
3. Курило Л.Ф. Хромосомные заболевания органов половой системы // Клиническая и экспериментальная морфология. 2015. Т. 13. № 1. С. 48-59.
4. Лебедев И.Н. Эпигенетические аспекты нарушений эмбрионального развития человека // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 3. С. 15-19.
5. Черных В.Б., Яманди Т.А., Сафина Н.Ю. Новые молекулярные технологии в диагностике генетических причин мужского бесплодия // Андрология и генитальная хирургия. 2017. Т. 18. №1. С. 10-22.
6. Брагина Е.Е., Сорокина Т.М., Арифалин Е.А., Курило Л.Ф. Генетически обусловленные формы патозооспермии. Обзор литературы и результаты исследований // Андрология и генитальная хирургия. 2015. Т. 16. № 3. С. 29-39.
7. Alhomaedah D., McGowan R., Ahmed S.F. The current state of diagnostic genetic tests for conditions affecting sex development // Clin. Genet. 2017. V. 91. №2. P. 157-162.
8. Баранов В.С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. СПб: Издательство Н-Л, 2006. 640 с.
9. Никитина Т.В., Лебедев И.Н. Цитогенетика привычного невынашивания беременности // Генетика. 2014. Т. 50. № 5. С. 501-514.
10. Саженова Е.А., Лепшин М.В., Лебедев И.Н. Множественные эпимутации импринтома при нарушении репродукции человека // Медицинская генетика. 2014. Т. 13. № 3 (141). С. 19-27.
11. Саженова Е.А., Скрыбин Н.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. Мультилокусные эпимутации импринтома при патологии эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. 2012. Т. 46. № 2. С. 204-213.
12. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., Parfenyev S.E., Mekina I.D. et al. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality // Oncotarget. 2017 Jun 1. doi: 10.18632/oncotarget.18331
13. Baranov V.S., Ivaschenko T.E., Liehr T., Yarmolinskaya M.I. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015. V. 185. P. 59-65.
14. Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Артюхова В.Г., Светлаков А.В., Лебедев И.Н. Преимплантационная генетическая диагностика на основе бластоцентеза: проблемы и перспективы // Генетика. 2016. Т. 52. № 1. С. 5-13.
15. Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Лебедев И.Н. Технологии молекулярно-генетического анализа на основе внеклеточных нуклеиновых кислот в пренатальной и преимплантационной генетической диагностике. В сб-ке: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике Новосибирск, 2015. С. 118-136.
16. Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Четчина Н.Н., Мельников А.А. и др. Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности // Медицинская генетика. 2013. Т. 12. № 1 (127). С. 26-35.
17. Bagheri H., Mercier E., Qiao Y., Stephenson M.D., Rajcan-Separovic E. Genomic characteristics of miscarriage copy number variants // Mol Hum Reprod. 2015. V. 21. P. 655-661.
18. Bashamboo A., Ledig S., Wieacker P., Achermann J.C., McElreavey K. New technologies for the identification of novel genetic markers of disorders of sex development (DSD) // Sex Dev. 2010. V. 4. №4-5. P. 213-224.
19. Baxter R.M., Arboleda V.A., Lee H., Barseghyan H., Adam M.P. et al. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development // J Clin Endocrinol Metab. 2015. V. 100. №2. E333-E344.
20. Bug S., Solfrank B., Schmitz F., Pricelius J., Stecher M. et al. Diagnostic utility of novel combined arrays for genome-wide simultaneous detection of aneuploidy and uniparental isodisomy in losses of pregnancy // Mol Cytogenet. 2014. V. 7. P. 43.
21. Filges I., Friedman J.M. Exome sequencing for gene discovery in lethal fetal disorders — harnessing the value of extreme phenotypes // Prenat Diagn. 2014. V. 35. №10. P. 1005-1009.
22. Hillman S.C., Willams D., Carss K.J., McMullan D.J., Hurler M.E. et al. Prenatal exome sequencing for fetuses with structural abnormalities: the next step // Ultrasound Obstet Gynecol. 2015. V. 45. P. 4-9.
23. Qiao Y., Wen J., Tang F., Martell S., Shomer N., Leung P.C., Stephenson M.D., Rajcan-Separovic E. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss // Mol Hum Reprod. 2016. V. 22. №5. P. 364-372.
24. Nakamura S., Miyado M., Saito K., Katsumi M., Nakamura A. et al. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations // Andrology. 2017. V. 5. №4. P. 824-831.
25. Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W.P., Tyson C., Qiao Y. et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // Hum Reprod. 2010; V. 25. P. 2913-2922.
26. Rajcan-Separovic E., Qiao Y., Tyson C., Harvard C., Fawcett C. et al. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects // Mol Hum Reprod. 2010. V. 16. P. 125-134.
27. Viaggi C.D., Cavani S., Malacarne M., Floriddia F., Zerega G. et al. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH // J Appl Genet. 2013. V. 54. P. 353-359.
28. Hughes I.A., Houk C., Ahmed S.F., Lee P.A. Consensus statement on management of intersex disorders // Arch Dis Child. 2006. V. 91. №7. P. 554-563.
29. Tobias ES, McElreavey K. Next generation sequencing for disorders of sex development // Endocr Dev. 2014. V. 27. P. 53-62.
30. Dong Y., Yi Y., Yao H., Yang Z., Hu H. et al. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development // BMC Med Genet. 2016. V. 17. P. 23.
31. Eggers S., Sadedin S., van den Bergen J.A., Robevska G., Ohnesorg T. et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort // Genom Biol. 2016. V. 17. №1. P. 243.
32. Quaynor S.D., Bosley M.E., Duckworth C.G. et al. Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome // Mol Cell Endocrinol. 2016. V. 437. P. 86-96.
33. Черных В.Б. AZF делеции — частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований. Проблемы репродукции. 2009. №1. С. 10-15.
34. Krausz C., Chianese C., Giachini C., Guarducci E., Laface I. et al. The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility // J Endocrinol Invest. 2011. V. 34. №5. P. 376-382.
35. Lo Giacco D., Chianese C., Sanchez-Curbelo J., Bassas L., Ruiz P. et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnos-

- tic genetic laboratory // *Eur J Hum Genet*. 2014. V. 22. №6. P. 754-761.
36. Yan Y., Yang X., Liu Y., Shen Y., Tu W. et al. Copy number variation of functional RBMY1 is associated with sperm motility: an azoospermia factor-linked candidate for asthenozoospermia // *Hum Reprod*. 2017 May 12:1-11. doi: 10.1093/humrep/dex100.
37. Krausz C., Giachini C., Lo Giacco D., Daguin F., Chianese C. et al. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males // *PLoS One*. 2012. V. 7. №10. P. e44887.
38. Chianese C., Gunning A.C., Giachini C., Daguin F., Balercia G. et al. X chromosome-linked CNVs in male infertility: discovery of overall duplication load and recurrent, patient-specific gains with potential clinical relevance // *PLoS One*. 2014. V. 9. №6. P. e97746.
39. Lo Giacco D., Chianese C., Ars E., Ruiz-Castane E., Forti G. et al. Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility // *J Med Genet*. 2014. V. 51. №5. P. 340-344.
40. Yatsenko A.N., Georgiadis A.P., Ropke A., Berman A.J., Jaffe T. et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men // *N Engl J Med*. 2015. V. 372. №22. P. 2097-2107.
41. Choi Y., Jeon S., Choi M., Lee M.H., Park M. et al. Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive azoospermia // *Hum Mutat*. 2010. V. 31. №7. P. 788-793.
42. Курило Л.Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих. Хронология и динамика развития гонад, гамет и фолликулов человека и млекопитающих животных. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012, 282 pp.
43. Fonseca D.J., Patino L.C., Suarez Y.C., de Jesus Rodriguez A., Mateus H.E. et al. Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations // *Fertil Steril*. 2015. V. 104. №1. P. 154-62.e2.
44. Laissue P. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing // *Mol Cell Endocrinol*. 2015. V. 411. P. 243-257.
45. Quilter C.R., Karcianas A.C., Bagga M.R., Duncan S., Murray A. et al. Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF) // *Hum Reprod*. 2010. V. 25. №8. P. 2139-2150.
46. Jaillard S., Akloul L., Beaumont M., Hamdi-Roze H., Dubourg C. et al. Array-CGH diagnosis in ovarian failure: identification of new molecular actors for ovarian physiology // *J Ovarian Res*. 2016. V. 9. №1. P. 63.
47. Lee Y., Kim C., Park Y., Pyun J.A., Kwack K. Next generation sequencing identifies abnormal Y chromosome and candidate causal variants in premature ovarian failure patients // *Genomics*. 2016. V. 108. V. 5-6. P. 209-215.
48. Soellner L., Begemann M., Degenhardt F., Geipel A., Eggermann T. et al. Maternal heterozygous NLRP7 variant results in recurrent reproductive failure and imprinting disturbances in the offspring // *Eur J Hum Genet*. 2017. V. 25. №8. P. 924-929.
49. Chen Y., Bartanus J., Liang D., Zhu H., Breman A.M. et al. Characterization of chromosomal abnormalities in pregnancy losses reveals critical genes and loci for human early development // *Hum Mutat*. 2017. V. 38. №6. P. 669-677.
50. Filges I., Nosova E., Bruder E., Tercanli S., Townsend K. et al. Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype // *Clin Genet*. 2014. V. 86. P. 220-228.

## Интерхромосомная и интрахромосомная инсерции с участием хромосомы 2

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

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»  
E-mail: maramin@mail.ru

Представлено два семейных случая инсерций с участием хромосомы 2. В обоих случаях хромосомный дисбаланс в виде дупликации инсертированного района является следствием мейотической сегрегации инсерции у отцов-носителей перестройки. Случай 1 характеризуется несбалансированной интерхромосомной инсерцией у пациента, обследованного по поводу задержки темпов психомоторного развития, судорог неизвестной этиологии и аномального фенотипа. В результате комплексного обследования пациента и его родителей установлен следующий кариотип: 46,XY,der(2)ins(2;7)(q35;q31.33q34)pat. Случай 2 представлен несбалансированной интрахромосомной инсерцией у пациента с неонатальными судорогами. Стандартное цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое обследование пациента и его родителей позволили определить кариотип пациента: 46,XY,rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat. Носительство инсерций характеризуется высоким репродуктивным риском, поэтому очень важным является идентификация и характеристика данной хромосомной перестройки. Современные высокотехнологичные молекулярные методы исследования позволяют значительно расширить диагностические возможности выявления геномного дисбаланса, но при этом не позволяют установить, в каком именно месте генома располагается дополнительный материал. FISH-анализ помогает не только подтвердить наличие дублированного участка, но и идентифицировать его локализацию. Только комплексный подход, заключающийся в сочетании стандартного цитогенетического исследования кариотипа с использованием молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов, позволяет установить природу хромосомной перестройки, повысить качество медико-генетического консультирования семьи для оценки прогноза потомства и определить тактику пренатальной или предимплантационной диагностики.

**Ключевые слова:** интрахромосомные инсерции, интерхромосомные инсерции, стандартное цитогенетическое исследование, хромосомный микроматричный анализ, флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## Interchromosomal and intrachromosomal insertions involving a chromosome 2

Minzhenkova M.E., Markova Z.G., Dadali E.L., Shilova N.V.

Federal State budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»  
E-mail: maramin@mail.ru

We report two familial cases of insertional translocations with chromosome 2. Both abnormalities were derived from fathers having a balanced insertion. In case 1 patient was referred for evaluation because of developmental delay, seizures of unknown etiology and slight dysmorphic features showed a normal karyotype. Complex approach to diagnosis of the proband's and his family allowed to determine karyotype as 46,XY,der(2)ins(2;7)(q35;q31.33q34)pat. In case 2 patient with neonatal seizures was referred for evaluation. Combined with the conventional cytogenetic studies and FISH analyses proband's karyotype was determined as 46,XY,rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat. In both this cases only complex approach such as CMA, FISH and conventional cytogenetics allows to perform a complete quality diagnosis.

**Key words:** interchromosomal insertional translocations, intrachromosomal insertional translocations, conventional cytogenetic studies, chromosomal microarray, fluorescence *in situ* hybridization.

### Введение

Инсерции являются достаточно редкой хромосомной патологией в цитогенетической практике. Так как при формировании инсерции может быть, по крайней мере, три точки разрывов, частота их возникновения гораздо ниже, чем других структурных хромосомных аномалий с одной или двумя точками разрывов. В последние годы приблизительно в 20 раз увеличилась оценка частоты встречаемости этой группы перестроек [1]. Если раньше она составляла 1:10 000 [2], то в некоторых источниках последних лет эта частота достигает 1:500 [1]. Очевидно, это связано с внедрением современных

молекулярно-генетических технологий, таких, как хромосомный микроматричный анализ (ХМА) и секвенирование ДНК, что позволило значительно расширить возможности выявления хромосомного дисбаланса у пациентов. Однако не только диагностика геномного дисбаланса, но и определение его происхождения является значимым для прогноза потомства. Носительство инсерций характеризуется высоким репродуктивным риском. Вероятность иметь потомство с несбалансированным хромосомным набором в среднем составляет 32% для мужчин и 36% для женщин-носителей инсерций [3], причем этот риск увеличивается, если инсертированный

фрагмент небольшого размера (<1% гаплоидной длины аутосом; HAL), и снижается при размере фрагмента >1,5% HAL. Идентифицировать сбалансированные инсерции кроме стандартного цитогенетического метода позволяет флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Инсерции образуются в результате разрывов хромосом в трех точках: две точки разрыва с формированием интерстициального сегмента в одной хромосоме, и одна точка разрыва в районе хромосомы, куда инсерируется этот сегмент. В зависимости от ориентации инсертрованного фрагмента к центромере перестроенной хромосомы различают прямые инсерции, когда хромосомный фрагмент встраивается в той же ориентации, или инвертированные, когда вставка имеет обратное расположение.

Сбалансированные *интерхромосомные инсерции* образуются в результате вставки хромосомного материала из одной хромосомы в другую негомологичную хромосому, то есть они характеризуются интерстициальной делецией в одной хромосоме и интерстициальной вставкой этого материала в другую негомологичную хромосому. Это наиболее часто встречающийся вид инсерций [2]. Так как сегменты, участвующие в образовании интерхромосомной инсерции, не являются реципрокными, геномный дисбаланс, образующийся в результате сегрегации, может быть обусловлен сегментными моносомиями или трисомиями, соответственно.

*Интрахромосомные инсерции*, так называемые «центромерные сдвиги» («centromere shifts»), возникают в пределах одной хромосомы и могут быть внутривлевыми или межвлевыми, прямыми или инвертированными. В популяции человека этот вид хромосомной перестройки встречается крайне редко: в литературе представлено около 40 публикаций со случаями интрахромосомных инсерций [4, 5]. Особые сложности вызывает цитогенетическая диагностика этого типа хромосомных перестроек, поскольку зачастую они интерпретируются как парацентрические инверсии [6].

### Материалы и методы

Анализ кариотипа пациентов и их родственников был выполнен на хромосомных препаратах из культуры лимфоцитов периферической крови. Дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом проводили по стандартным протоколам. FISH-анализ выполняли по протоколам, предложенным фирмой-производителем цельнохромосомных ДНК-зондов XCP 2, XCP 7, (MetaSystems, Германия). Многоцветную FISH проводили с набором mBAND (XCyte) для соответствующих хромосом 2, 7 (MetaSystems, Германия) по протоколам фирмы-производителя. Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы ThermoBrite (Abbott Molecular, США). Для контрокрасивания хромосом использовали флуоресцентный краситель DAPI. Молекулярно-цитогенетический анализ проводился на флуоресцентном микроскопе AxioI-

mager M.1 (Zeiss) с соответствующим набором светофильтров и с использованием компьютерной программы обработки FISH-изображения (Isis, MetaSystems, Германия). ХМА проводили на платформе «Affymetrix» с использованием олигонуклеотидных микроматриц высокой плотности Cytoscan™ HD (Affymetrix®, США), содержащих 2696550 маркеров (1953246 непалиморфных маркеров и 749157 SNPs) (Applied Biosystems). Все стадии лабораторного этапа анализа выполняли в соответствии с протоколом производителя Applied Biosystems. Анализ полученных данных осуществляли с использованием программы Chromosome Analysis Suite (ChAS) (версия 2.0). Оценка патогенности обнаруженного дисбаланса проводилась с использованием баз данных OMIM, ISCA, DECIPHER и DGV. Кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой ISCN 2013 [7].

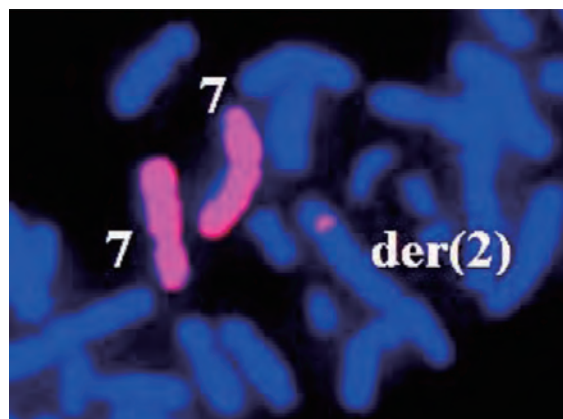


Рис. 1. Результат FISH с цельнохромосомным ДНК-зондом на хромосому 7.

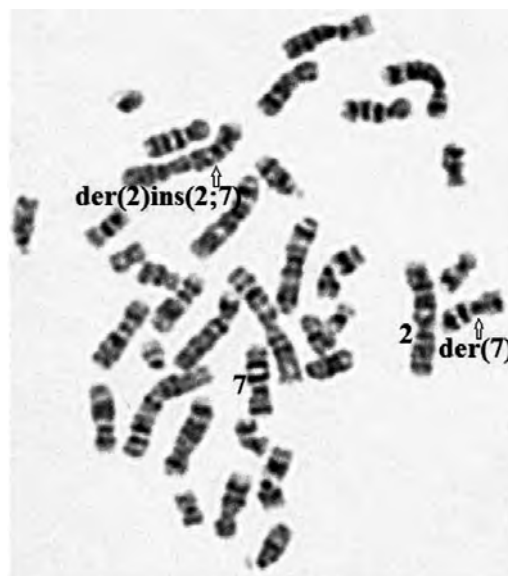


Рис. 2. Метафазная пластинка интерстициальной инсерцией ins(2;7).

## Результаты

Представлено два семейных случая инсерций с участием хромосомы 2.

*Случай 1.* Пациент, 1,5 лет, обследован по поводу задержки темпов психомоторного развития, судорог неизвестной этиологии, синдрома дисплазии соединительной ткани, врожденного нистагма, утолщенных пальцев стоп. При стандартном цитогенетическом исследовании определен кариотип пациента — 46,XY. ХМА показал дупликацию участка длинного плеча хромосомы 7 с позиции 124,533,538 до позиции 140,719,797, захватывающую районы 7q31.33q34. FISH-анализ с использованием цельнохромосомного ДНК-зонда на хромосому 7 (ХСР 7) позволил определить вставку дублированного участка в хромосому 2 (рис. 1). Размер инсерции составил 0,56% HAL.

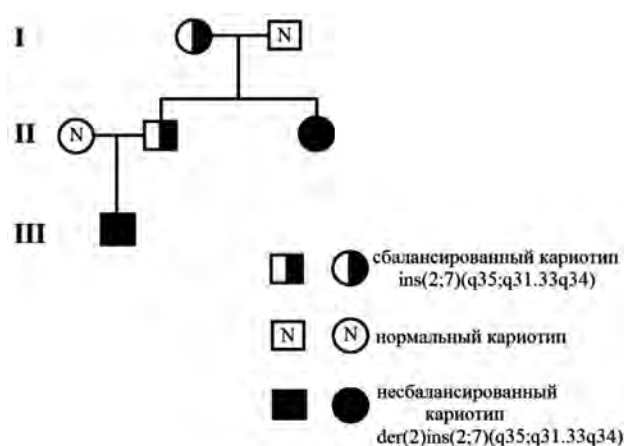


Рис. 3. Родословная пациента с семейной инсерцией  $ins(2;7)$ .

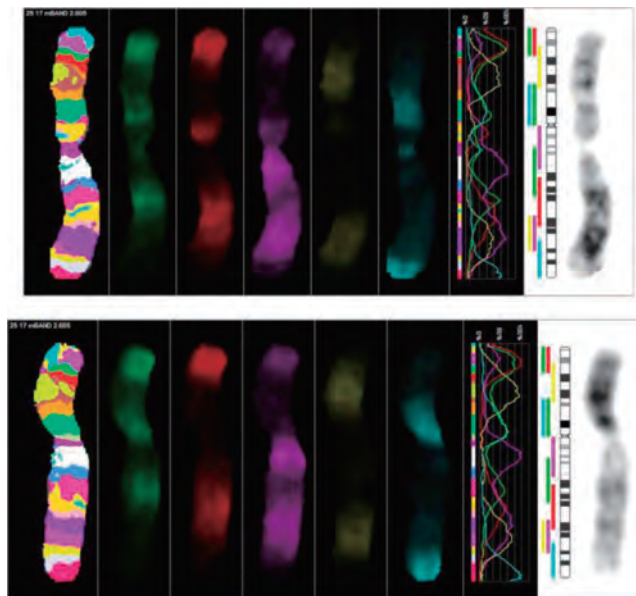


Рис. 4. Результат молекулярно-цитогенетического анализа с использованием mBAND 2.

Было проведено стандартное цитогенетическое исследование родителей пациента. У отца обнаружена сбалансированная инсерция материала хромосомы 7 (q31.33q34) в районе q35 длинного плеча хромосомы 2 (рис. 2). mBAND 7 позволил охарактеризовать инсерцию как прямую. В сочетании с этими данными кариотип пробанда: 46,XY,der(2)ins(2;7)(q35;q31.33q34)pat. Кроме того, было проведено обследование родственников пациента. В возрасте 6 лет тете пробанда в связи с наличием умственной отсталости легкой степени, низким ростом, короткой шеей, вальгусной деформацией голени провели стандартное цитогенетическое исследование. Кариотип был определен как нормальный. В настоящий момент (возраст 38 лет) при ХМА определен тот же геномный дисбаланс, что и у племянника. FISH-исследование с использованием цельнохромосомных ДНК-зондов подтвердило несбалансированную интерхромосомную инсерцию. Бабушка пациента по отцовской линии также является носителем сбалансированной интерхромосомной инсерции: 46,XX,ins(2;7)(q35;q31.33q34), что было обнаружено при исследовании ее кариотипа. Таким образом, два члена этой семьи имеют дупликацию захватывающую районы 7q31.33q34, вследствие мейотической сегрегации инсерции у носителей в двух поколениях (рис. 3).

*Случай 2.* Пациент, 1,6 года, с неонатальными судорогами обследован методом секвенирования ДНК (панель «Наследственные эпилепсии»). По итогам анализа покрытия (избыточности прочтения) секвенированных генов получены данные в пользу наличия дупликации сегмента хромосомы 2 с приблизительными границами 152,955,143—177,017,680, захватывающей районы 2q23.3q31.1. FISH-исследование пробанда и его родителей с использованием цельнохромосомного ДНК-зонда на хромосому 2 не выявило межхромосомных инсерций и транслокаций. При стандартном цитогенетическом исследовании родителей пациента у отца обнаружена сбалансированная интрахромосомная инсерция сегмента длинного плеча хромосомы 2 (q23.3q31) в короткое плечо хромосомы 2 (p11.2). mBAND 2 позволил охарактеризовать инсерцию, как инвертированную (рис. 4).

В соответствии с происхождением рекомбинантной хромосомы 2 вследствие мейотической сегрегации внутрихромосомной инсерции хромосомы 2 отца, кариотип пациента определен: 46,XY,rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat.

## Обсуждение

Поведение хромосом с инсерцией в мейозе в большей степени зависит от размера инсертированного сегмента и определяется конъюгацией гомологичных хромосом в биваленте (рис. 5) при вставках маленького размера либо формированием квадрилентов при значительных инсерциях.

В случае 1 механизмом образования несбалансированной интерхромосомной инсерции у пациента является независимый синапсис гомологичных пар в период мейотического деления I, когда в стадии пахитены гомологи независимо конъюгируют с формированием бивалента. Гомологи могут конъюгировать по всей их длине, что приведет к некоторому несовпадению сегментов, находящихся рядом друг с другом (гетеросинапсис) [3]. Этот механизм независимого синапсиса наиболее вероятно реализуется при инсерциях небольшого размера ( $HAL < 1\%$ ). Независимая 2:2 сегрегация этих двух бивалентов может приводить к образованию четырех возможных типов гамет в соотношении 1:1:1:1. Два из них сбалансированы по количеству генетического материала и приводят к формированию нормальных и сбалансированных зигот. Два других имеют геномный дисбаланс, и из них формируются зиготы с сегментными анеусомиями, вследствие дупликации или делеции по инсертированному фрагменту.

В случае инсерций довольно крупного размера ( $HAL > 1,5\%$ ) образуется квадριвалент, который содержит инсерционную петлю и обеспечивает полную конъюгацию хромосом, вовлеченных в перестройку. Если в инсерционной петле кроссинговер не происходит, то сегрегация хромосом проходит как в биваленте. Но когда кроссинговер происходит в инсерционной петле, мейотическая сегрегация квадριвалента приводит к образованию рекомбинантных хромосом с различными сегментными анеусомиями [3].

Жизнеспособность зигот или вероятность повторного рождения больного ребенка, зависит от вида и размера анеусомии. Теоретически, рассчитать эмпирический риск рождения больного ребенка в семье носителя инсерции можно при использовании клинико-генеалогического метода, а именно, при анализе родословной и определении соотношения типов сегрегации. Но, к сожалению, проведение такого исследования не всегда возможно в силу малочисленности семьи или отсутствия информации о генетическом статусе родственников в предыдущих поколениях. Теоретический риск рождения ребенка с несбалансированным хромосомным набором составляет 50% [8].

Так, в случае 1 небольшой фрагмент из длинного плеча хромосомы 7 (7q31.33-q34) инсертировался в участок длинного плеча хромосомы 2. Размер инсерции составил 0,56% HAL, что определяет механизм образования инсерции — независимый синапсис гомологичных пар. Образование несбалансированных гамет может приводить к формированию зигот с сегментной дупликацией 7q31.33-q34 и с делецией этого хромосомного участка. Однако в семье наблюдались только случаи с дупликацией инсертированного сегмента. Учитывая, что у пациентов с несбалансированной инсерцией, представленной сегментной дупликацией, отмечены незначительные аномалии фенотипа и легкая степень умственной отсталости, можно предположить, что жизне-

способностью обладают только зиготы с сегментной дупликацией 7q31.33-q34, а зиготы с моносомией по этому участку хромосомы являются эмбриолеталями. Анализ сегрегации в данной семье выявил соотношение 0:1:2:0 следующих типов гамет — нормальный : сбалансированный : сегментная дупликация : сегментная делеция. Таким образом, в данной семье эмпирический риск рождения больного ребенка высчитывается по формуле  $1/0+1+2+0$ , и составляет 33%. Расхождение между теоретическим и наблюдаемым риском обусловлено эмбриональной летальностью зигот при некоторых типах геномного дисбаланса. Можно предположить, что коэффициент выживаемости всегда будет увеличиваться с уменьшением размера инсерции и наличия геномного дисбаланса в виде сегментной дупликации.

В случаях интрахромосомных инсерций при мейотической конъюгации инсертированный сегмент и комплементарный ему район на нормальном гомологе могут образовывать петлю, что способствует синапсису или конъюгации неперестроенной части хромосомы (рис. 5) [3]. Кроссинговер в паре с интерстициальным сегментом такого бивалента будет приводить к формированию рекомбинантных хромосом либо с дупликацией, либо с делецией по инсертированному сегменту (рис. 6).

В случаях с инсерциями значительного размера, полная конъюгация между гомологом с инсерцией и нормальным гомологом в мейозе может происходить путем формирования двойной петли. Кроссинговер или рекомбинация этих полностью конъюгировавших хромосом приводит к образованию хромосом с дупликацией и/или делецией. По данным, представленным в статье Melotte с соавт., при сегрегации таких инсерций возможно формирование 26 сегрегационных вариантов [9].

В обзоре Madan и Menko представлен анализ мейотической сегрегации 27 случаев интрахромосомных инсерций [4]. Определено, что в семье носителей инсерции с зарегистрированными случаями рождения ребен-

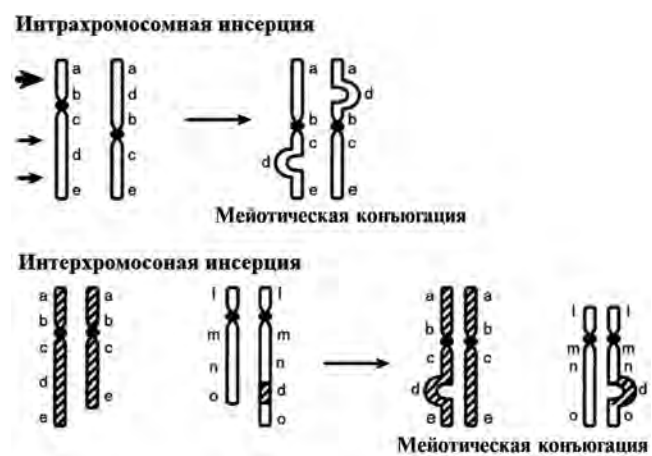


Рис. 5. Схема мейотической конъюгации между хромосомой с инсерцией и нормальным гомологом.

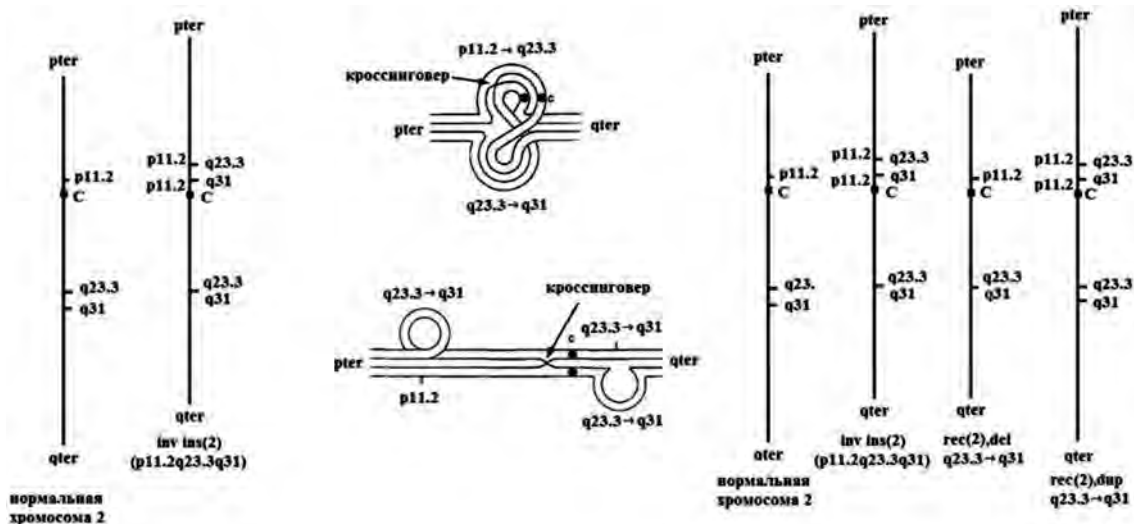


Рис. 6. Механизм образования рекомбинантной хромосомы 2 –  $rec(2)dup(2q)inv ins(2)(p11.2q23.3q31)pat$

ка с несбалансированным кариотипом, повторный риск составляет 15%. Теоретически, этот риск может значительно отличаться для каждого случая инсерции, в зависимости от размера инсертированного сегмента и жизнеспособности зигот с сегментными анеусомиями в аномальных рекомбинантных хромосомах.

Для носителей межплечевых, так называемых перичентрических инсерций вероятность иметь ребенка с аномальной рекомбинантной хромосомой достаточно высокая и варьирует в пределах 15%–50% [4, 10]. Тем не менее, межплечевая интрахромосомная инсерция хромосомы 2 встречается экстремально редко, в литературе описано только 4 таких случая [10–13].

При сбалансированных инсерциях не происходит изменения числа копий перестроенных участков хромосом, что не должно приводить к аномальному фенотипу. Однако в некоторых случаях фенотипический эффект может наблюдаться вследствие перемещения блока структурных генов из одного хромосомного окружения в другое, что связано с эффектом положения. Механизм формирования варибельно аномального фенотипа может быть следующим:

- 1) инсертированный сегмент может содержать один или несколько активно транскрибируемых генов, что непосредственно приводит к функциональной анеусомии по дозозависимым генам;
- 2) вставка дополнительного хромосомного материала может нарушить последовательность генов и привести к потере или усилению их функции;
- 3) делеция или дупликация во фланкирующей области гена может привести к аномальной экспрессии генов из-за эффекта положения [1].

В обоих представленных случаях дублированные сегменты содержат около 100 различных генов (в соответствии с электронным ресурсом UCSC Genome Browser), функции большинства которых до сих пор не известны. Поэтому не

представляется возможным проследить четкую корреляцию «генотип-фенотип» у этих пациентов.

Инсерции довольно редко диагностируют при проведении стандартного цитогенетического исследования. По немногочисленным сообщениям частота инсерций среди новорожденных, установленных рутинным методом анализа, составляет 1:10 000 [2, 8]. Использование комбинации ХМА и FISH-анализа позволило значительно повысить уровень детекции как семейных случаев, так и инсерций, возникших *de novo*. В работе Kang и соавт. приводятся данные, что при повторном анализе методом ХМА 18 000 образцов ДНК пациентов с ранее установленным нормальным кариотипом, было выявлено 40 случаев инсерций, что составляет 1:500 и свидетельствует о 160-кратном увеличении частоты встречаемости инсерций [1].

Интерстициальные несбалансированные инсерции, представленные дупликациями, у пациентов с аномалиями фенотипа, должны быть обязательно идентифицированы. Определение структуры хромосомной аномалии необходимо для установления возможного механизма формирования перестройки и подсчета генетического риска, который, как известно, выше у носителей инсерций, чем у носителей других структурных хромосомных аномалий [3]. Особое внимание стоит уделить родителям пациентов с несбалансированными инсерциями для выявления семейных случаев, так как при этом меняется алгоритм медико-генетического консультирования и определяется необходимость пренатальной диагностики.

## Выводы

Несмотря на то, что инсерции являются достаточно редким типом структурных хромосомных аномалий, высокий риск повторного рождения детей с несбалансированным хромосомным набором заставляет отно-



ситься к таким случаям с предельной настороженностью. Несомненно, современные, высокотехнологичные молекулярные методы исследования позволяют значительно расширить диагностические возможности выявления геномного дисбаланса, но при этом не позволяют установить, в каком именно месте генома располагается дополнительный материал. FISH-анализ помогает не только подтвердить наличие дуплицированного участка, но и идентифицировать его локализацию. Только комплексный подход, заключающийся в сочетании стандартного цитогенетического исследования кариотипа с использованием молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов, позволяет установить природу хромосомной перестройки, повысить качество медико-генетического консультирования семьи для оценки прогноза потомства и определить тактику пренатальной или предимплантационной диагностики.

#### Список литературы

1. Kang SHL, Show C. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet.* 2010;(152A):1111-1126.
2. Van Hemel JO, Eussen HJ. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet.* 2000;(107):415-432.
3. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome abnormalities and genetic counseling* 4th ed. 2012.
4. Madan K., Menko F.H. Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet.* 1992;(89):1-9.
5. Ardalan A, Prieur M, Choiset A, et al. Intrachromosomal insertion mimicking a pericentric inversion: molecular cytogenetic characterization of a three break rearrangement of chromosome 20. *Am J Med Genet.* 2005;(138A):288-293.
6. Madan K, Nieuwint AWM. Reproductive risks for paracentric inversion heterozygotes: inversion or insertion? That is the question. *Am J Med Genet.* 2002;(107):340-343.
7. Shaffer L. An international system for human cytogenetic nomenclature (ISCN). *Int. Karger.* 2013.
8. Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CAL et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2012;(20):166-170.
9. Melotte C, Debrock S, D'Hooghe T, et al. Preimplantation genetic diagnosis for an insertional translocation carrier. *Hum Reprod.* 2004;(19):2777-2783.
10. Friedrich U, Houman M. Microdissection of chromosome 2-between-arm intrachromosomal insertion. *Eur J Hum Genet.* 2000;(8):393-395.
11. Therkelsen AJ, Hulten M, Jonasson J, et al. Presumptive direct insertion within chromosome 2 in man. *Ann Hum Genet.* 1973;(36):367-373.
12. Pai GS, Rogers JF, Sommer A. Identical multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndrome due to del(2)(q32) in two sisters with intrachromosomal insertional translocation in their father. *Am J Med Genet.* 1983;(14):189-195.
13. Manolakos E, Vetro A, Papadopoulou E. Partial trisomy 2p and partial monosomy 2q arising from a paternal intrachromosomal 2q-into-2p between-arm insertion and paracentric inversion: molecular cytogenetic characterization of a four-break rearrangement. *Cytogenet Genome Res.* 2013;(140):12-20.

# Цитогенетические нарушения у больных раком легкого: феномен *rogue cells* в клетках крови

Баканова М.Л.<sup>1</sup>, Минина В.И.<sup>1,2</sup>, Тимофеева А.А.<sup>1</sup>, Головина Т.А.<sup>1,2</sup>, Савченко Я.А.<sup>1</sup>, Рыжкова А.В.<sup>1</sup>, Титов Р.А.<sup>1</sup>, Асанов М.А.<sup>1,2</sup>, Титов В.А.<sup>3</sup>, Вафин И.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», mari-bakano@ya.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»

<sup>3</sup> ГБУЗ Кемеровской области Областной клинический онкологический диспансер

<sup>4</sup> ГКУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови»

Обследовано 890 жителей Кемеровской области: 440 больных раком легкого (РЛ), первично поступивших на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер (до забора крови для цитогенетического исследования больные не получали химиотерапевтического или радиологического лечения) и 450 жителей той же местности без онкологических заболеваний (доноры Кемеровской областной станции переливания крови близкого возраста, которые к моменту сбора материала не имели хронических заболеваний, не принимали лекарственных препаратов, в течение 3-х месяцев до начала исследования не подвергались рентгенологическим обследованиям). Все обследованные подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании. Целью данного исследования стал анализ уровня хромосомных aberrаций в нетрансформированных соматических клетках (лимфоцитах крови) у больных раком легкого. Материалом для исследования послужила периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях. Культивирование лимфоцитов крови для получения препаратов хромосом осуществляли по стандартному полумикрометоду. Статистическая обработка материала проводилась с использованием методов непараметрической статистики, реализованных в программе «Statistica 10.0» (StatSoft, Inc., USA). Установлено, что частота хромосомных aberrаций в клетках крови у больных РЛ в Кемеровской области ( $3,02 \pm 1,95\%$ ) превышала опубликованные ранее данные литературы для таких пациентов и была статистически значимо выше, чем у здоровых жителей той же местности ( $2,05 \pm 1,83\%$ ;  $U_{M-W} = 68077,00$ ;  $p = 0,000001$ ; с коррекцией на конфаундеры:  $p_{adj} = 0,004$ ). У 8 больных РЛ были зарегистрированы *rogue cells* (клетки со множественными перестройками обменного типа), тогда как в группе здоровых жителей той же местности таких клеток выявлено не было. У пациентов с *rogue cells* по сравнению с больными РЛ, не имеющими таких повреждений хромосом, была повышена частота метафаз с единичными aberrациями хромосом ( $3,74 \pm 1,24$ ; Me: 3,40 против  $3,00 \pm 1,96$ ; Me: 3,00) и aberrациями хромосомного типа ( $1,58 \pm 0,89$ ; Me: 1,65 против  $0,97 \pm 1,39$ ; Me: 0,50;  $p = 0,013627$ ).

**Ключевые слова:** рак легкого; хромосомные aberrации; *rogue cells*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ: 16-15-00034 «Разработка тест-системы для доклинической диагностики онкологических рисков у рабочих предприятий угольного цикла»

## Cytogenetic damage in blood cells of lung cancer patients: *rogue cell* phenomenon

Bakanova M.L.<sup>1</sup>, Minina V.I.<sup>1,2</sup>, Timofeva A.A.<sup>1</sup>, Golovina T.A.<sup>1,2</sup>, Savchenko Ya.A.<sup>1</sup>, Ryzhkova A.V.<sup>1</sup>, Titov R.A.<sup>1</sup>, Asanov M.A.<sup>1</sup>, Titov V.A.<sup>3</sup>, Vafin I.A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budget Scientific Institution

«The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», mari-bakano@ya.ru

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Kemerovo state University»

<sup>3</sup> Kemerovo Regional Clinical Oncological Dispensary

<sup>4</sup> State public health institution of Kemerovo region «Kemerovo regional blood center»

In the presented «case-control» study 890 residents of the Kemerovo Region subject to age, sex, ethnicity and smoking status were included. We formed two groups: 1) «Case» — 440 newly diagnosed lung cancer patients undergoing a medical treatment in the Kemerovo Regional Oncology Center (diagnosis «lung cancer» was determined by experienced doctors from the Kemerovo Regional Oncology based on the results of special medical examination); 2) «Control» — 450 healthy donors of the Kemerovo Regional Center of Blood Transfusion. The aim of this study was the analysis chromosomal aberrations (CAs) in lung cancer patients and healthy donors resident in the same territory. The following methods were used in our investigation: the routine method of lymphocytes cultivation and chromosomal aberration analysis. Statistical analysis was performed using nonparametric statistics (Mann-Whitney U Test for paired comparison of quantitative characteristics), logistic regression. It was determined that the CAs frequency (both chromatid- and chromosome-type aberrations) was significant increased in lung cancer patients compared to control group. Furthermore in 8 lung cancer patients were found *Rogue cells* that were contained polycentric, ring chromosomes and multiple pair dot fragments.

**Key words:** lung cancer; chromosomal aberrations; *rogue cells*.

### Введение

Рак легкого (РЛ) — это широко распространенная форма злокачественных новообразований и одна из важнейших медицинских и социально-экономических проблем во всем мире. Известно, что риск РЛ существенно возрастает при воздействии канцерогенных веществ, поступающих в организм человека из окружающей среды. Курение, ультрафиолетовое, ионизирующее излучения, воздействие генотоксикантов производственной среды могут приводить к формированию объемных аддуктов и разрывов нитей ДНК, что может приводить к накоплению хромосомных aberrаций (ХА) в клетках и вызывать их злокачественную трансформацию. Изучение клеток опухолей легкого показало присутствие сложного кариотипа с различными числовыми и структурными изменениями, часто включающими такие регионы хромосом как 3p, 5p, 9p, 8q, 17q, 19q (в случае немелкоклеточного рака легкого) и 3q, 5p, 8p, Xq (для мелкоклеточного). Результаты секвенирования плоскоклеточной карциномы демонстрируют накопление «драйверных» мутаций в генах *TP53*, *GRM8*, *BAI3*, *ERBB4*, *RUNX1T1*, *KEAP1*, *FBXW7*, *KRAS*, амплификаций в генах *SOX2*, *PIK3CA*, *FGFR1*, *IGF1R*, *EphA2*, *MET*, *p53/MDM2*, *PDGFRA/4q12* [1]. Таким образом, перестройки хромосом затрагивают сайты локализации ключевых онкогенов, генов-супрессоров опухоли, важных транскрипционных факторов, что, возможно, отражает особенности процессов канцерогенеза, их специфику при различных гистологических типах РЛ [2].

С другой стороны, процессы, протекающие в не-трансформированных клетках онкологических больных, изучены гораздо слабее. Вместе с тем, накопление повреждений хромосом в лимфоцитах периферической крови можно рассматривать как индикатор накопления генетических изменений в тканях организма, пока не затронутых трансформацией, но подвергающихся мощному канцерогенному воздействию. Была сформулирована гипотеза, согласно которой уровень генетических повреждений в лимфоцитах крови отражает уровень повреждений в клетках-предшественниках, вовлеченных в канцерогенез в различных тканях [3].

Спонтанные ХА в лимфоцитах крови — одна из наиболее частых форм генетических аномалий, вызванных мутагенным воздействием факторов окружающей среды

[4] и, по мнению ряда авторов, они могут предшествовать онкологическим процессам в организме, служить значимым биомаркером риска рака [5–9].

Цитогенетические исследования ХА в лимфоцитах крови больных солидными опухолями в последнее время получили широкое распространение [5–10]. Данные литературы свидетельствуют о повышении уровня повреждений хромосом даже в нетрансформированных клетках онкологических больных, что может отражать высокий уровень генотоксической нагрузки и повышенную индивидуальную чувствительность к действию мутагенов, связанную с унаследованными вариантами генов, контролирующих репарацию ДНК, клеточный цикл, апоптоз, антиоксидантную систему и другие защитные механизмы. С другой стороны, накопление клеток с повреждениями хромосом может отражать степень прогрессии опухоли, метастазирование и выход опухолевых клеток в кровоток. В связи с этим особое внимание привлекают метафазы, характеризующиеся наличием сразу нескольких сложных перестроек, например, хромосомного типа, описываемые в литературе как *gague cells* (RC). Есть предположение, что возникновение таких клеток играет немаловажную роль в прогрессии опухолевого процесса [11]. Цитогенетические исследования лимфоцитов крови у больных РЛ пока крайне немногочисленны, выполнены на малых по объему выборках, нуждаются в верификации [8–10].

Проведение таких исследований особенно актуально для жителей промышленных регионов, в которых воздействие факторов окружающей среды значительно увеличивает генотоксические и канцерогенные риски для населения. В связи с этим, целью данного исследования является анализ цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови больных РЛ Кемеровской области.

### Материалы и методы

Обследовано 890 жителей Кемеровской области. 440 человек — это больные РЛ, первично поступившие на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер (табл. 1).

До забора крови для цитогенетического исследования больные не получали химиотерапевтического или радиологического лечения и составили исследуемую

Таблица 1

Характеристика обследованных групп

Характеристики групп		Больные РЛ	Группа сравнения (здоровые)
Возраст, лет (среднее значение ± стандартное отклонение)		59,67 ± 7,64	50,26 ± 7,32
Всего обследовано		440	450
Мужчины		378	338
Женщины		62	112
Статус курения	Курящие	353	209
	Некурящие	87	241

группу. После проведения обследования специалистами онкологического диспансера у всех обследованных была выявлена немелкоклеточная форма РЛ, определены стадия заболевания и наличие или отсутствие метастазов (табл. 2).

450 человек группы сравнения (табл. 1) — 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-х месяцев до начала исследования не подвергались рентгенологическим обследованиям. Все представители группы сравнения не имели признаков онкопатологии в анамнезе и близких родственников (I, II степень родства) с онкозаболеваниями.

Все обследованные доноры подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании. Проведенные исследования соответствовали этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН.

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях в системы «Вакутейнер» с гепарином и транспортировавшаяся в цитогенетическую лабораторию Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН. Культивирование лимфоцитов крови для получения препаратов хромосом осуществляли по стандартному полумикрометоду [4]. Подготовка препаратов хромосом, отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям [4]. Каждый препарат шифровали и анализировали два независимых исследователя. Использовали микроскопы: AxioImager M2, Axioskop 2 plus. Сложные случаи ХА анализировали коллегиально с использованием мультидискуссионной системы (Carl Zeiss), а затем верифицировали в цитогенетической лаборатории кафедры генетики Кемеровского государственного университета.

У каждого индивида анализировали от 200 до 1000 метафаз. Учитывали частоту ХА (частота клеток, несущих ХА, %), частоту aberrаций хроматидного типа и частоту aberrаций хромосомного типа (рассчитывались как отношение числа aberrаций определенного типа к числу проанализированных метафаз). К aberrациям хроматидного типа относили: одиночные фрагменты, хроматидные обмены. К aberrациям хромосомного типа относили: парные фрагменты, дицентрики, кольцевые хромосомы, атипичные моноцентрики, хромосомные обмены, RC учитывали отдельно. Статистическая обработка материала проводилась с использованием программы «Statistica 10.0» (StatSoft, Inc., USA).

Для цитогенетических показателей рассчитывали медианы, размах (минимум-максимум), выборочное стандартное отклонение, средние значения, их стандартные ошибки. Распределение всех использованных показателей сравнивалось с нормальным методом Колмогорова—Смирнова. По результатам анализа установлено, что распределение значений частоты ХА отличалось от нормального. На основании этого в дальнейшем для сравнения групп использовали ранговый U-тест Манна—Уитни.

Эффекты цитогенетических нарушений, ассоциированные с риском развития РЛ, были изучены путём логистического регрессионного анализа. Отношение шансов (OR) было рассчитано по модифицированной формуле для малых выборок с учетом поправок на конфаундеры (пол, возраст, курение). Для всех полученных значений был определен 95% доверительный интервал (CI). Критерием значимости считалось значение  $p < 0,05$ .

Эффекты цитогенетических нарушений, ассоциированные с риском развития РЛ, были изучены путём логистического регрессионного анализа. Отношение шансов (OR) было рассчитано по модифицированной формуле для малых выборок с учетом поправок на конфаундеры (пол, возраст, курение). Для всех полученных значений был определен 95% доверительный интервал (CI). Критерием значимости считалось значение  $p < 0,05$ .

## Результаты

В результате проведенного исследования установлено, что средняя частота ХА у больных РЛ значимо выше, чем в группе сравнения, как по уровню aberrаций хроматидного типа, так и по уровню aberrаций хромосомного типа (табл. 3). Анализ уровня ХА обследованных в зависимости от пола и статуса курения также выявил значимые отличия у мужчин (табл. 3). Женщины с диагнозом РЛ характеризовались повышенной частотой кле-

Таблица 2

Характеристика больных РЛ

Тип РЛ	Плоскоклеточный	268 (60,9%)
	Аденокарцинома	107 (24,3%)
	Крупноклеточный	65 (14,8%)
pTNM	0, I, II	223 (50,7%)
	III, IV	217 (49,3%)
Метастазы	Есть	270 (61,4%)
	Нет	170 (38,6%)

ток с ХА и aberrаций хромосомного типа, а различия по уровню aberrаций хроматидного типа не достигли статистической значимости. Достоверных различий по уровню цитогенетических повреждений между мужчинами и женщинами в обеих группах выявлено не было, а отношение шансов для ХА у больных РЛ после введения поправок на конфаундеры составило:  $OR_{adj} = 1,07$ ; 95% CI = 1,02–1,12;  $p_{adj} = 0,004196$ . Сопоставление уровня хромосомных нарушений у больных РЛ и здоровых с учетом статуса курения позволило установить, что частота ХА была статистически значимо выше у больных РЛ как в группах курильщиков ( $p = 0,000001$ ), так и некурящих индивидов ( $p = 0,000002$ ). Таким образом, на фоне действия одного и того же фактора (курения) у больных РЛ повреждений было больше, чем у здоровых. Это указывает на снижение репаративных возможностей у данной группы лиц. К повышению частоты ХА может приводить и влияние самой опухоли, например, через повышение окислительного стресса или дефицит антиоксидантов в организме.

При сравнении здоровых (частота ХА:  $2,05 \pm 1,83\%$ ) с больными РЛ, дифференцированными по патоморфологическому диагнозу, стадиями и наличию/отсутствию метастазов, наблюдались статистически значимые отличия для групп больных плоскоклеточным ( $3,02 \pm 1,87\%$ ; Me: 3,00;  $p = 0,000001$ ;  $OR_{adj} = 1,09$ ; 95% CI = 1,03–1,15;  $p_{adj} = 0,006013$ ), крупноклеточным РЛ ( $3,06 \pm 1,84\%$ ; Me: 3,00;  $p = 0,000005$ ;  $OR_{adj} = 1,18$ ; 95% CI = 1,06–1,30;  $p_{adj} = 0,005533$ ), аденокарциномой ( $2,97 \pm 2,24$ ; Me: 2,50;  $p = 0,000025$ ;  $OR_{adj} = 1,11$ ; 95% CI = 1,02–1,19;  $p_{adj} = 0,017646$ ). Превышение уровня ХА по сравнению с группой сравнения было также у больных с I–II стадией ( $2,93 \pm 1,89\%$ ; Me: 2,83;  $p = 0,00000$ ;  $OR_{adj} = 1,09$ ;

95% CI = 1,03–1,15;  $p_{adj} = 0,008171$ ), с III–IV стадией ( $3,10 \pm 2,02\%$ ; Me: 3,00;  $p = 0,000001$ ;  $OR_{adj} = 1,10$ ; 95% CI = 1,04–1,17;  $p_{adj} = 0,003442$ ), у пациентов, имеющих метастазы ( $3,12 \pm 2,00\%$ ; Me: 3,00;  $p = 0,000001$ ;  $OR_{adj} = 1,09$ ; 95% CI = 1,03–1,15;  $p_{adj} = 0,003008$ ) и у больных без метастазов ( $2,85 \pm 1,87\%$ ; Me: 2,50;  $p = 0,000001$ ;  $OR_{adj} = 1,09$ ; 95% CI = 1,02–1,17;  $p_{adj} = 0,013446$ ).

Между группами больных РЛ с отдельными формами, стадиями и наличием/отсутствием метастазов отличий уровня ХА выявлено не было.

Таким образом, ХА у пациентов с РЛ регистрируются статистически значимо чаще, чем у здоровых. Кроме клеток с единичными aberrациями у больных были найдены лимфоциты, «нагруженные» aberrациями хромосомного типа: парными фрагментами, транслокациями, дицентрическими, полицентрическими и кольцевыми хромосомами. В мировой литературе такие мульти-абберрантные клетки известны под названием RC) [14]. Типичный фенотип RC был диагностирован в 8 случаях больных РЛ, с частотой  $0,00383 \pm 0,04\%$  (табл. 4). Максимальное количество aberrаций, зарегистрированное в одной клетке, было 35: трицентрических хромосом — 6, дицентрических хромосом — 7, атипичных моноцентриков — 2, парных фрагментов — 20.

Все носители RC — это курящие мужчины, жители Кемеровской области, со средним возрастом  $59,75 \pm 4,23$  лет (табл. 5). Преобладающей патоморфологической формой был плоскоклеточный РЛ (62,5%), 2 стадия (37,5%), большинство (62,5%) имели метастазы, 75% контактировали с генотоксикантами на производстве.

Таблица 3

Частота встречаемости хромосомных нарушений (%) в сравниваемых группах

Типы хромосомных нарушений	Больные РЛ, n = 440			Группа сравнения, n = 450			p
	Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	Медиана	Минимум-максимум	Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	Медиана	Минимум-максимум	
<b>Общая группа</b>							
Частота клеток с ХА	$3,02 \pm 1,95$	3,00	0,00-10,00	$2,05 \pm 1,83$	1,50	0,00-10,00	0,000001
Аберрации хроматидного типа	$2,11 \pm 1,55$	2,00	0,00-8,00	$1,64 \pm 1,59$	1,00	0,00-8,00	0,000001
Аберраций хромосомного типа	$0,98 \pm 1,38$	0,50	0,00-12,50	$0,42 \pm 0,70$	0,00	0,00-5,50	0,000001
<b>Мужчины</b>							
Частота клеток с ХА	$3,01 \pm 1,94$	3,00	0,00-10,00	$2,02 \pm 1,88$	1,50	0,00-10,00	0,000001
Аберрации хроматидного типа	$2,11 \pm 1,51$	2,00	0,00-8,00	$1,61 \pm 1,67$	1,00	0,00-8,00	0,000001
Аберрации хромосомного типа	$0,98 \pm 1,31$	0,50	0,00-9,00	$0,42 \pm 0,67$	0,00	0,00-3,50	0,000001
<b>Женщины</b>							
Частота клеток с ХА	$3,05 \pm 2,08$	2,68	0,00-9,00	$2,15 \pm 1,66$	2,00	0,00-7,50	0,007832
Аберрации хроматидного типа	$2,12 \pm 1,76$	2,00	0,00-7,00	$1,73 \pm 1,33$	2,00	0,00-5,00	0,296079
Аберрации хромосомного типа	$0,97 \pm 1,77$	0,50	0,00-12,50	$0,42 \pm 0,81$	0,00	0,00-5,50	0,001858

Уровень метафаз с единичными аберрациями у больных с РС превышал уровень у больных без РС ( $3,74 \pm 1,24$ ; Me: 3,40 против  $3,00 \pm 1,96$ ; Me: 3,00), статистически значимые различия получены по аберрациям хромосомного типа ( $1,58 \pm 0,89$ ; Me: 1,65 против  $0,97 \pm 1,39$ ; Me: 0,50;  $p = 0,013627$ ).

### Обсуждение

Данное исследование сфокусировано на изучении ХА у пациентов с первично диагностированным РЛ. Выбор заболевания обусловлен его широкой распространенностью в мире [12] и Кемеровской области [13], значимым вкладом экологических факторов в его возникновение (а значит и актуальностью его изучения у населения промышленных регионов), существованием наследственной предрасположенности к его возникновению при условии действия триггерных факторов среды.

Высокую интенсивность мутационного процесса в организме больных РЛ отражают полученные нами показатели повреждаемости хромосом. Высокий уровень ХА в клетках крови связывают с повышением риска онкологических заболеваний в многочисленных исследованиях. Так, например, исследования, проведен-

ные в Тайване, выявили возрастание риска рака в 9 раз у людей с частотой  $ХА > 4,023\%$  [6]. Bonassi с соавт. обнаружили ассоциацию между риском возникновения рака и наличием ХА, обобщив результаты цитогенетического исследования 22 358 субъектов из 11 стран [7].

Результаты данного исследования согласуются с многочисленными результатами исследований нестабильных ХА в клетках крови у больных РЛ [8, 9]. Частота ХА, полученная у пациентов в данном исследовании (Кемеровская область, РФ), оказалась выше, чем у больных РЛ, проживающих в Словакии ( $3,14 \pm 0,10\%$  против  $2,86 \pm 1,45\%$ ) [8], что может быть связано с более интенсивным воздействием факторов окружающей среды в Кемеровской области. Интенсивные выбросы промышленных предприятий в области обуславливают кризисную экологическую ситуацию в регионе.

В изученной выборке больных РЛ жителей Кемеровской области был зарегистрирован такой цитогенетический показатель, как РС. Феномен РС изучен слабо. Одной из причин возникновения этого цитогенетического явления называют плотноионизирующее излучение, создаваемое альфа-частицами, попадающими в организм человека в результате вдыхания радиоактивного газа радона [14]. Радон является установленным канцерогеном для человека, долгосрочное воздействие кото-

Таблица 4

#### Rogue cells у больных РЛ

Номер индивида	Изучено клеток	Аберрантных клеток, %	Rogue cells, %	Нарушения в rogue cells
1	1100	2,73	0,09	Dic-5, t -2, fra// -8, dm-8
2	1100	3,80	0,10	Dic-2, R-1, t -1, fra// -6, dm-8
3	1100	4,10	0,10	Tric-1, R-1, fra// -4, dm-1
4	1200	2,30	0,10	Tric-1, Dic-6, R-2, fra// -4, dm-13
5	200	3,00	0,50	Tric-6, Dic-7, t -2, fra// -10, dm-10
6	200	3,00	0,50	Tric-1, Dic-5, R-4, fra// -3, dm-17
7	600	5,20	0,20	R-2, t -1, fra// -3
8	1000	5,80	0,10	Dic-1, R-2, fra// -4, dm-3

Таблица 5

#### Характеристика больных РЛ, имеющих Rogue cells

Номер индивида	Патоморфологический диагноз	Стадия заболевания	Метастазы	Возраст	Профессия	Место жительства
1	Плоскоклеточный	3	+	63	Проходчик	Прокопьевск
2	Крупноклеточный	2	+	55	Механизатор	Ижморка
3	Аденокарцинома	2	+	67	Электросварщик	Кемерово
4	Плоскоклеточный	1	—	62	Инженер	Ленинск-Кузнецкий район
5	Аденокарцинома	4	+	54	Кочегар	Тайга
6	Плоскоклеточный	2	—	59	Водитель	Киселёвск
7	Плоскоклеточный	4	+	59	Рабочий	Киселёвск
8	Плоскоклеточный	1	—	59	Механизатор	Тяжинский район

рого, вызывает, прежде всего, онкопатологию легких. Так, по ряду исследований, он стал основной причиной РЛ не только у шахтеров, работающих под землей [15], но и у населения, подверженного воздействию радона в помещении [16]. Согласно данным геофизического районирования территория Кемеровской области относится к категории опасных по радону и продуктам его распада [17], и это может стать возможной причиной появления RC у отдельных групп жителей Кемеровской области [17].

Другую возможную причину индукции RC, связывающую с инфекционным фактором. В исследованиях Lazutka с соавт. частота RC достоверно коррелирует с высокими титрами антител к вирусам полиомы (JCV, BKV) [18]. A Neel с соавт. выдвинули гипотезу о том, что RC не только связаны с JCV, но и оказывают влияние на онкогенез [19].

Не стоит исключать влияние на формирование RC также процессов злокачественной трансформации в организме. У большинства больных с RC (62,5%) были выявлены метастазы. Известно, что опухолевые клетки в процессах метастатического каскада могут выходить в системный кровоток, становясь свободно циркулирующими [20]. RC в кровотоке онкологических больных с солидными опухолями описаны впервые нами ранее [10] и подтверждены в данном исследовании.

Остается много неясного в понимании роли и механизмов участия RC в процессах малигнизации. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят расширить представления о причинах возникновения RC у больных РЛ и установить возможную биомедицинскую роль этого явления.

### Список литературы

1. Heist RS, Sequist LV, Engelman JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol*. 2012; 5: 924-957.
2. Пузырев ВП, Огородова ЛМ. Генетика бронхолегочных заболеваний. М: Атмосфера. 2010. 160с.
3. Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*. 1998; 58:4117-4121
4. Бочков НП, Чеботарев АН, Катосова ЛД и др. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека. *Генетика*. 2001; 37(4): 549-557.
5. Исламов ЗС, Гильдиева МС, Усманов РХ. Анализ цитогенетических изменений и их роль в ранней диагностике ретинобластомы. *Практическая медицина*. 2015; 1: 137-139.
6. Liou SH, Lung JC, Chen YH et al. Increased chromosome type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res*. 1999. 59(7): 1481-1484.
7. Bonassi S, Norppa H, Ceppi M et al. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*. 2008; 29(6): 1178-1183.
8. Vodenkova S, Polivkova Z, Musak L et al. Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients. *Mutagenesis*. 2015. 30(4): 557-563.
9. Vodicka P, Polivkova Z, Sytarova S et al. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis*. 2010. 31: 1238-1241.
10. Minina VI, Sinitsky MYu, Druzhinin VG et al. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. *Eur. J. Cancer Prevention*. 2016; 25(4): 70-77.
11. Пилинская МА, Шеметун АМ, Дыбский СС и др. Выявление мультиабберрантных лимфоцитов при цитогенетическом обследовании различных групп людей, контактирующих с мутагенными факторами. *Цитология и генетика*. 1994. 28. (1): 27 — 32.
12. Jemal A, Bray F, Center M et al. Global cancer statistics. *Cancer J. Clin*. 2011; 61: 69-90.
13. Мун СА, Глушков АН. Расчет прогнозов заболеваемости раком легкого у мужчин в связи с техногенным загрязнением атмосферы в Кемеровской области. *Гигиена и санитария*. 2014; 2: 37-41.
14. Awa AA, Neel JV. Cytogenetic 'rogue' cells: what is their frequency, origin, and evolutionary significance? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 1021-1025.
15. National Research Council. Health Effects of Exposure to Radon (BEIR VI). Washington, DC: National Academy Press, 1999, 516p.
16. Schoenberg JB, Klotz JB, Wilcox HB et al. Case-control study of residential radon and lung cancer among New Jersey women. *Cancer Res*. 1990; 50:6520-6524
17. Druzhinin V, Bakanova M, Fucic A et al. Lymphocytes with multiple chromosomal damages in a large cohort of West Siberia residents: Results of long-term monitoring. *Mutat Res*. 2016; 784:1-7.
18. Lazutka JR, Neel JV, Major EO et al. High titers of antibodies to two human polyomaviruses, JCV and BKV, correlate with increased frequency of chromosomal damage in human lymphocytes. *Cancer Lett*. 1996; 109: 177-183.
19. Neel JV, Major EO, Awa AA et al. Hypothesis: Rogue cell-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A*. 1996; 93: 2690-2695.
20. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66: 8319-26.

# Диагностика хронических лейкозов с применением методов молекулярной цитогенетики. Особенности методологии

**Возилова А.В.**

ФГБУН Уральский Научно-Практический Центр Радиационной Медицины, г. Челябинск, e-mail: vozilova@urcrim.ru

Цитогенетические методы исследования клеток костного мозга и периферической крови у лиц с онкогематологическими диагнозами широко используются для диагностики заболеваний и оценки их степени тяжести. Разнообразие методов окраски хромосом позволяет наиболее полно оценить генетические аномалии, что важно для определения тактики лечения и прогноза течения заболеваний. Поскольку лаборатории часто ограничены в финансовых средствах, важно выработать подходы для выбора цитогенетического метода анализа. Цель настоящей работы заключалась в анализе цитогенетической патологии в клетках костного мозга у лиц с хроническими формами лейкозов с применением трех методов окраски, что позволило сформировать методологию цитогенетического исследования для разных групп заболеваний (хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз, множественная миелома, первичный миелофиброз). В работе были использованы: дифференциальное GTG-окрашивание, 24-цветный FISH. У лиц с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) препараты окрашивались с использованием локуспецифичных зондов: ATM(11q22)/TP53(17p13) и DLEU(13q14)/LAMP(13q34)/cen12(12p11.1;12q11.1). Результаты исследования позволили заключить: дифференциальное окрашивание позволяет выявить все структурные перестройки хромосом, но только при идеальном качестве препарата, что при работе с костным мозгом бывает не часто. Использование 24-цветного FISH позволяет выявить транслокации, даже если качество хромосом не очень хорошее. Метод хорошо зарекомендовал себя для поиска комплексных транслокаций. Коктейль локуспецифичных зондов при ХЛЛ показал высокие эффективность и скорость получения результатов. Цитогенетический анализ в динамике позволяет оценить особенности мутационного процесса в ходе лечения.

**Ключевые слова:** хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз, множественная миелома, первичный миелофиброз, цитогенетическое исследование, флуоресцентная in situ гибридизация, транслокации хромосом, локуспецифическое флуоресцентное окрашивание.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

**Благодарность.** Автор выражает глубокую благодарность врачам-гематологам Русакову М.Н., Димову Г.П., сотрудникам клинического отделения ФГБУН УНПЦ РМ врачу-гематологу Бойко Д.В. и мед. сестрам Царенко Н.И. и Пятниченко Т.В. за сотрудничество в работе. Слова признательности хочется выразить старшим лаборантам лаборатории радиационной генетики Сыченко З.И., Чикиревой И.А., Киселевой Е.В. за техническое сопровождение исследований. Особые слова благодарности автор выражает руководителю регионального гематологического центра Коробкину А.В. за содействие в работе.

## Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemias by Means of Methods of Molecular Cytogenetics. Characteristics of the Methodology

**Vozilova A.V.**

Federal State Government-Funded Institution of Science Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical-Biological Agency, Chelyabinsk

Cytogenetic methods of cell study of bone marrow and peripheral blood in individuals with onco-hematological diseases are widely used for stating a diagnosis and severity assessment. Diversity of methods of chromosome painting enables to fully assess genetic aberrations that is important for treatment strategy identification and prediction of course and prognosis of the disease. Since laboratories often have funding limits it is important to develop approaches for selecting a cytogenetic method for the analysis. The goal of the present work is to analyze cytogenetic abnormality in bone marrow cells in individuals with chronic leukemia by means of three methods of painting that enabled to form a methodology of cytogenetic research for different groups of diseases (chronic myeloleukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and primary myelofibrosis). In the present work we have used: G-banding, 24-colour FISH technique. For the individuals with CLL we have used of locus-specific probes: ATM(11q22)/TP53(17p13) and DLEU(13q14)/LAMP(13q34)/cen12(12p11.1;12q11.1). Summarizing the research results we have come to the following conclusions: differential painting enables to identify all chromosome transformations but only in case of ideal chromosome quality which is not the case with bone marrow. The use of 24-colour FISH technique enables to identify translocations even if the chromosome quality is not good. This method attained credibility for searching complex translocations. The cocktail of locus-specific probes for CLL cases demonstrated high efficiency and a high speed of obtaining results. Cytogenetic analysis in the dynamics allows evaluating the peculiarities of a mutation process in the course of treatment.

**Key words:** chronic myeloleukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, primary myelofibrosis, cytogenetic research, fluorescence in situ hybridization, chromosome translocations, locus-specific fluorescence painting.



## Введение

Цитогенетические методы исследования клеток костного мозга и периферической крови у лиц с онкогематологическими заболеваниями широко используются во всем мире для диагностики заболеваний и для оценки степени их тяжести. В некоторых случаях на основе результатов исследования хромосом в клетках больного врач определяется с тактикой лечения, а проведенный повторно цитогенетический анализ позволяет оценить эффективность лечения [1].

Современные технические возможности, такие, как приборы для автоматического поиска метафазных пластинок, оцифровка изображений и программное обеспечение для кариотипирования хромосом, большое разнообразие методов окраски хромосом или их локусов, позволяют исследователю получить максимум информации и обнаружить не только рекуррентные для данного заболевания аберрации, но и увидеть новые перестройки, которые образовались в клетках в результате опухолевой прогрессии, и могут быть уникальными для каждого клинического случая. Возможности использования разных методов окраски, в основе которых лежит флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), могут помочь в описании полной цитогенетической картины онкогематологического заболевания. Однако каждый метод исследования довольно дорогостоящий и требует разное количество времени от момента забора образца биологического материала до получения результата (необходимо время для культивирования клеток, обработки их суспензии, окраски метафазных пластинок, оцифровки изображений и непосредственно кариотипирования). При таком разнообразии подходов и ограниченном количестве времени, учитывая поток биологического материала в лаборатории, исследователь должен определиться с методологией или критериями, которые будут использованы для получения оптимального результата.

Цель настоящего исследования заключалась в формировании методологии цитогенетического исследования для оценки цитогенетической патологии в клетках костного мозга у лиц с хроническими формами лейкозов.

## Материалы и методы

Исследование было проведено с 2014 по 2016 гг. В клиническом отделении Уральского научно-практического центра радиационной медицины г. Челябинска проходили лечение лица старше 18 лет с хроническими формами лейкозов. Всего для анализа цитогенетических результатов были сформированы четыре группы пациентов: с хроническим миелолейкозом (ХМЛ), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), множественной миеломой (ММ), первичным миелофиброзом (ПМФ). Выбор групп для исследования объяснялся высокой степенью распространенности данной патологии у взрослого населения, а также высокой вероятностью обнаружения цитогенетических аномалий при этих заболеваниях согласно данным литературы [1–3]. Больные не дифференцировались по времени постановки диагноза, по степени тяжести заболеваний и т.д. Количество обследованных лиц и типы окраски хромосом представлены в таблице.

Всего за период наблюдения было обследовано 38 человек, в динамике дважды была обследована одна женщина с диагнозом ММ. Как видно из таблицы, многие пациенты имели по два разных цитогенетических исследования. Всем больным ХЛЛ, кроме одного человека, было проведено исследование на интерфазных клетках с применением локуспецифичных зондов.

Аспират костного мозга (1 мл) после биопсии помещался в культуральную смесь, которая содержала гепарин (0,5 мл), среду RPMI-1640 (5 мл), сыворотку эмбриональную телячью (0,5 мл), колцемид. При диагнозе ХЛЛ в культуральную смесь вводили фитогемагглютинин (ФГА). Клетки культивировали 24 часа при 37°C, затем готовили препараты хромосом по принятому в лаборатории цитогенетическому протоколу [4].

Для окраски метафазных хромосом использовали дифференциальное GTG-окрашивание, которое основано на предварительной обработке хромосом трипсином [5]. Метод является «золотым стандартом» цитогенетического исследования и позволяет выявлять все известные хромосомные перестройки. Однако для анализа с использованием этого метода необходимо, чтобы метафазных пластинок на стекле было достаточное количество и хромосомы были оптимальной для анализа длины. Также метафазные хромосомы окрашивали

Таблица

Количество обследованных лиц с применением различных цитогенетических методов окрашивания хромосом или локусов хромосом

Заболевание	Кол-во человек	Пол обследованных		Методы окраски		
		М	Ж	GTG	24-цветный FISH	Int FISH
ХМЛ	5	3	2	2	5	—
ХЛЛ	11	5	6	1	7	10
ММ	11	3	8	3	10	—
ПМФ	11	5	6	8	6	—

с применением метода FISH (24-цветная FISH-окраска) (пр-во Германия, Метасистемс). В результате такого подхода каждая пара хромосом имела индивидуальную окраску, что позволяло быстро и надежно определять хромосомные обмены. Для оценки генетических аномалий у лиц с ХЛЛ использовали коктейли локуспецифичных зондов для интерфазных клеток. Коктейли содержали зонды к тем участкам хромосом, которые наиболее часто мутируют при ХЛЛ: ATM (11q22)/TP53 (17p13) и DLEU (13q14)/LAMP (13q34)/cen12 (12p11.1; 12q11.1) (пр-во Германия, Метасистемс). Для флуоресцентных методик использовали протоколы, которые предлагались производителем.

Для выбора метода окрашивания сначала подсчитывали количество метафазных пластинок на неокрашенном стекле. Если при поперечном пересечении стекла находили более двух метафаз, то применяли дифференциальное окрашивание. Если при поперечном пересечении стекла находили одну клетку или одна клетка встречалась реже, то применяли мультицветное FISH окрашивание. У больных ХЛЛ при отсутствии достаточного количества метафаз окрашивали интерфазные клетки с применением локуспецифичных зондов.

Анализ хромосом проводили при световой или флуоресцентной микроскопии. Для формирования архива использовали автоматический поиск метафаз и оцифровку изображений, которую выполняли на Метафере (Германия). Анализ дифференциально-окрашенных препаратов проводили с использованием программного обеспечения (ПО) Ikaros, а флуоресцентные изображения анализировали с применением ПО Isis (Метасистемс, Германия). При анализе метафазных хромосом считали все клетки, которые были на стекле (чаще от 10 до 50 клеток). В ходе анализа с локуспецифичными зондами анализировали от 150 до 400 интерфазных клеток. Оценивали количество клеток с одним, двумя и тремя сигналами. Затем рассчитывали процент клеток в норме и при отсутствии (del) или при увеличении сигналов (трисомии). При отсутствии одного сигнала не исключался факт потери клеткой хромосомы. Чтобы избежать ошибок в анализе считали большее количество клеток. Для записи цитогенетических аномалий использовали номенклатуру [6].

### Результаты

В группе лиц с ХМЛ был обследован костный мозг 5 человек. У всех пациентов было проведено исследование с применением мультицветной FISH-окраски, и у двоих пациентов была выполнена дифференциальная диагностика. У всех обследованных лиц подтвердилось наличие реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11) с образованием маркерной Ph-хромосомы. Состояние одного больного было тяжелое, он был резистентен к химиотерапии. Поскольку клеток на стекле было крайне мало, было решено применить для окраски ме-

тод 24-цветной FISH. При анализе у него помимо Ph-хромосомы был обнаружен клон клеток, который также содержал транслокацию t(8;10)(p11;p11). По данным литературы [7], транслокации, затрагивающие регион 8p11, характерны для миелоидной опухолевой трансформации клеток. Как показывают исследования, в подобной перестройке могут участвовать два разных гена — ген *FGFR1* и ген *MOZ*. Разрыв гена *FGFR1* связан с заболеванием, известным, как миелопрролиферативный 8p11 синдром. У таких пациентов болезнь протекает агрессивно и быстро трансформируется в острый миелоидный лейкоз. Мы не проводили молекулярно-генетической диагностики в данном случае, но у обследуемого пациента наблюдалось агрессивное течение заболевания, которое закончилось летально. По данным литературы при наличии транслокации, охватывающий регион 8p11, помочь больному могла только аллогенная трансплантация стволовых клеток при раннем выявлении аберрации.

В группе лиц с ММ было обследовано 11 пациентов. Для этого заболевания характерно вовлечение в различные перестройки хромосомы 14 [1]. У двух больных (18% обследованных) методом мультицветной FISH выявили транслокации с участием этой хромосомы. У мужчины обнаружили t(14;18)(p11.2;q21.2), и в двух клетках выявили делецию хромосомы 14 (del 14p11.2), т.е. аномалия затрагивала тот же регион, что был вовлечен в транслокацию. У женщины 56 лет в одной клетке было обнаружено наличие двух транслокаций t(4;14) и t(12;18). Необходимо отметить, что для сравнения эффективности методов окрашивания у двух пациентов применили GTG-окрашивание и FISH. Результаты не противоречили друг другу, но информативнее был флуоресцентный метод. Согласно работе [2], стандартным окрашиванием можно оценить цитогенетическую патологию только у 30% пациентов с этим диагнозом. Результаты FISH-анализа демонстрируют более высокий уровень детекции генетических аномалий при ММ. В нашем исследовании для лиц с диагнозом ММ было характерно присутствие клеток с нормальным кариотипом более чем в 50% случаев. Необходимо отметить, что в этой группе больных в клетках костного мозга чаще отмечались анеуплоидии и случаи кратного увеличения генома. У одной больной исследование было проведено дважды с перерывом в несколько месяцев для оценки эффективности лечения. После лечения количество клеток с нормальным кариотипом увеличилось вдвое (с 35% до 75%). В этой группе больных были отмечены делеции хромосом 1p, 5q, 5p, 11q, 13p, 13q, 14p, 17p.

В ходе исследования клеток костного мозга у больных с диагнозом ПМФ (всего 11 человек) у половины наблюдалась полиплоидия (от 50 до 132 хромосом). В этой группе было выполнено больше всего анализов с применением дифференциальной окраски — 8. В ходе цитогенетического анализа была обнаружена одинаковая аберрация — del 2q23 у двух пациентов (мужчина

56 лет и женщина 43 лет). В литературе мы не нашли подобных примеров [1, 8]. У трех пациентов были отмечены клетки с трисомией по хромосоме 21, что считается благоприятным прогностическим признаком при данном заболевании. Результаты исследований в этой группе показали, что чаще обнаруживались числовые аномалии, нежели чем структурные, что может быть связано с недостаточностью времени культивирования клеток костного мозга.

В группе лиц с диагнозом ХЛЛ было обследовано 11 человек. В 10 случаях было применено FISH-окрашивание интерфазных клеток с локуспецифичными зондами. В этой группе отмечался низкий пролиферативный индекс. В клетках костного мозга у 27% обследованных выявили трисомию по 12 хромосоме. У 50% пациентов были отмечены *del* 17p(TP53) и *del* 13q14(DLEU). В 7% случаев нами была отмечена *del* 11q22. В ходе хромосомного анализа методом FISH у одной пациентки выявили клон клеток с 4 транслокациями (*t*(3;7), *t*(4;17), *t*(4;5), *t*(7;13)). В других клетках эти aberrации встречались по отдельности, 14% клеток больной имели нормальный кариотип. У этой пациентки также обнаружили транслокацию с вовлечением хромосомы 14 *t*(14;17), которая наиболее часто мутирует при лимфатических опухолях. У одной больной в 8% клеток выявили транслокацию с вовлечением первой хромосомы *t*(1;12)(q43;p12). У двух пациентов была отмечена трисомия по хромосоме 21.

### Обсуждение

Цитогенетическое исследование костного мозга онкогематологических больных трудоемкий и дорогостоящий процесс, который играет существенную роль в постановке диагноза и в выборе тактики лечения. Учитывая, что при малигнизации клеток не всегда удается получить качественные хромосомы, чтобы провести исследование методом дифференциальной окраски хромосом, цитогенетику важно определиться с выбором методов, которые помогут получить исчерпывающую информацию о хромосомной патологии.

В ходе выполнения цитогенетических исследований у лиц с хроническими лейкозами, которые проходили лечение в клиническом отделении ФГБУН УНПЦ РМ, специалисты лаборатории радиационной генетики сформировали методологию, которая позволяет эффективно использовать современные лабораторные возможности. Исследовались четыре группы больных с диагнозами: ХМЛ, ММ, ПМФ, ХЛЛ. По данным литературы, при этих заболеваниях от 30% и более пациентов имеют аномалии кариотипа. Оценивались клетки костного мозга, которые культивировались 24 часа. При ХЛЛ клетки дополнительно стимулировали ФГА. Метод окрашивания выбирался индивидуально в зависимости от качества препарата и диагноза пациента. Если метафазных пластинок было мало, то применяли мульти-

цветное FISH-окрашивание, если наоборот, то хромосомы окрашивали дифференциально с применением трипсина. Для отбора максимального количества метафаз со стекла использовали прибор для автоматического поиска клеток и оцифровывания изображений. В нашем случае это был Метафер (пр-во Германия). Все препараты больных ХЛЛ были окрашены с применением локуспецифичных зондов.

Результаты исследования показали, что при высоком митотическом индексе и достаточной длине хромосом дифференциальное окрашивание позволяет выявлять возможные структурные перестройки хромосом (делеции, инверсии, транслокации и т.д.) и числовые нарушения. Однако этот анализ требует большого количества времени, и идеального качества хромосомных препаратов, что в онкогематологии бывает нечасто. В случае работы с 24-цветным FISH транслокации выявлялись быстрее даже при не очень хорошем качестве и разбросе хромосом. Метод хорошо зарекомендовал себя при анализе комплексных транслокаций, которые невозможно было полноценно оценить при дифференциальном окрашивании [9]. Наименьшее количество цитогенетических аномалий было отмечено в группе лиц с ПМФ. Такой результат можно объяснить тем, что мы культивировали клетки в течение 24 часов, что могло быть недостаточно для выхода клеток в митоз. В работе [8] указывается, что если время культивирования клеток больных ПМФ увеличить до 48 часов, то увеличится количество детектируемой цитогенетической патологии.

Используемый в нашем случае коктейль локуспецифичных зондов на интерфазные клетки при с ХЛЛ показал высокую эффективность. Этот подход позволил ускорить время получения результата, поскольку не требовалось культивировать клетки. Работа с интерфазными ядрами и применение FISH позволило уточнить часто встречающуюся патологию при данном лимфопролиферативном заболевании. Так, по данным литературы, при ХЛЛ наиболее часто выявляется делеция длинного плеча хромосомы 13 (55%), охватывающая регионы 13q12 и 13q14. В регионе 13q14.3 располагается онкосупрессорный ген ретинобластомы (*Rb1*), кодирующий ядерный белок фосфопротейн, участвующий в регуляции клеточного цикла. Чуть реже обнаруживаются трисомия хромосомы 12 (18%) и делеция хромосомы 11 (16%). Трисомия 12 коррелирует с атипическими морфологическими вариантами ХЛЛ, с повышенным содержанием пролимфоцитов и aberrантным иммунотипом. Делецию 11q, как правило, отмечали у больных в более молодом возрасте, она ассоциируется с быстрым прогрессированием заболевания и плохим прогнозом. С неблагоприятным прогнозом ассоциируется также делеция 17p13. В этом регионе располагается онкосупрессорный ген *p53*, непосредственно участвующий в индукции апоптоза при повреждении генома клеток [10]. Результаты нашей работы подтверждают вышеизложенное.

### Заключение

Подводя итоги исследованию, которое было проведено в 2014—2016 гг. в лаборатории радиационной генетики совместно с клиническим отделением ФГБУН УНПЦ РМ г. Челябинска, можно резюмировать, что информация, полученная с применением разных методов окрашивания хромосом, была не противоречива, а, наоборот, с применением нового цитогенетического подхода дополнялась или уточнялась. Каждый конкретный онкогематологический случай — индивидуален и требует индивидуальных подходов в диагностике. Результаты исследования в некоторых случаях (например, при обнаружении транслокации 8p) нуждались в подтверждении путём секвенирования генов, которые могли бы быть вовлечены в хромосомные перестройки. Как нам кажется, при таком комплексном подходе к молекулярно-цитогенетической диагностике лейкозов могут быть решены тактические задачи по выбору правильной и эффективной терапии, что увеличило бы процент положительных исходов в лечении заболеваний. Считаем, что цитогенетическое исследование клеток костного мозга необходимо проводить в динамике для оценки эффективности лечения и выявления онкогенных клонов клеток. Большим недостатком при исследовательской работе является то, что часть пациентов уходит из под наблюдения конкретного лечебного отделения, и не существует единой базы данных с информацией о пациенте, что не позволяет проводить анализ ситуации с учетом цитогенетической патологии. К примеру, за период наблюдения в динамике нами была обследована только одна пациентка, а из 38 обследованных нами лиц на сегодняшний день нам не известно состояние 16 чел. (42%). Все это не позволило нам проанализировать как влияет цитогенетическая патология на результаты лечения и состояние больного.

### Список литературы

1. Kaushansky K., Lichtmann M., Prchal J., Livi M., Press O., Burns L., Caligiuri M Williams Hematology 9<sup>th</sup> Edition. 2016, McGraw-Hill Education ISBN: 978-0-07-183301-1.
2. Гариффулин А.Д., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Салогуб Г.Н., Карягина Е.В., Абдулкадыров К.М., Четчин А.В. Генетические аномалии: влияние на эффективность терапии, выживаемость больных множественной миеломой, роль в оценке минимальной остаточной болезни. Медицинская генетика. 2016;9:29-39.
3. Мещерякова Л.М., Пороткова О.В., Ковалева Л.Г., Колозова Л.Ю., Бычкова С.Н. Первичный миелофиброз. Онкогематология. 2011; 4:50-57.
4. 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. Mutation Research. 2013.756 (1-2):115-118.
5. Estandarte Ana Katrina C. A Review of the Different Staining Techniques for Human Metaphase Chromosomes Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters in Research at the University of London February 24, 2012.
6. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). ISBN 978-3-318-02253-7
7. Macdonalda D., Reiterb A., Cross N. The 8p11 Myeloproliferative Syndrome: A Distinct Clinical Entity Caused by Constitutive Activation of FGFR1. Acta Haematol 2002;107:101-107.
8. Гиндина Т.Л., Мамаев Н.Н., Байков В.В., Бараншикова М.В., Николаева Е.Н., Петрова И.А., Моисеев И.С., Пирогова О.В., Власова Ю.Ю., Иванова М.О., Морозова Е.В., Бондаренко С.Н., Афанасьев Б.В. Новые горизонты цитогенетики при первичном миелофиброзе. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2016;9(1):61-69.
9. Loucas BD, Shuryak I, Cornforth MN. Three-Color Chromosome Painting as Seen through the Eyes of mFISH: Another Look at Radiation-Induced Exchanges and Their Conversion to Whole-Genome Equivalency. Front Oncol. 2016 Mar 15;6:52. doi: 10.3389/fonc.2016.00052.
10. Д.Ф. Глузман Л.М., Скляренко Т.С., Иванивская С.В., Коваль Н.К., Родионова Н.И., Украинская Л.Ю., Полудненко А., Джалилов Хронический лимфолейкоз: лабораторная диагностика и критерии прогноза. Онкология. 2014;16(3):171-176.

# Исследование генетической компоненты при разных клинических проявлениях туберкулеза

Гараева А.Ф.<sup>1</sup>, Рудко А.А.<sup>1</sup>, Брагина Е.Ю.<sup>1</sup>, Бабушкина Н.П.<sup>1</sup>, Колоколова О.В.<sup>2</sup>, Липаенкова О.Н.<sup>3</sup>, Пузырев В.П.<sup>1,2</sup>, Фрейдин М.Б.<sup>1</sup>

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

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия, anna-garaeva@medgenetics.ru

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

<sup>3</sup> ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр», г. Томск, Россия

Туберкулез (ТБ) является глобальной проблемой здравоохранения как во всем мире, так и в нашей стране, особенно на территории Сибирского федерального округа и Дальнего Востока. Общеизвестным является факт наличия генетических факторов, влияющих на предрасположенность к ТБ. Целью данной работы было изучение роли полиморфизмов генов системы IL-12/IFN- $\gamma$  в развитии разных клинических форм ТБ. Исследование проведено в выборке русских жителей г. Томска: больные ТБ (n = 331) и здоровые доноры (n = 279). Среди больных были выделены подгруппы пациентов с первичным (n = 61) и вторичным (n = 270) ТБ, а также пациенты с инфильтративной (n = 155) и диссеминированной формами (n = 68) ТБ. Показана ассоциация аллеля А и генотипа АА гена *STAT1* (rs2066797) с развитием вторичного ТБ (p = 0,0097). Кроме того, установлена ассоциация аллеля С и генотипа СС гена *IL12RB1* (rs17882555) с развитием инфильтративной формы заболевания (p < 0,001). Полученные результаты свидетельствуют о различиях в генетической подверженности отдельным клиническим формам ТБ.

**Ключевые слова:** туберкулез, полиморфизм, генетическая подверженность, синдром атипичных семейных микобактериозов.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-00558-а.

## Studying the role of genetic component in development of different clinical forms of TB

Garaeva A.F.<sup>1</sup>, Rudlo A.A.<sup>1</sup>, Bragina E.Yu.<sup>1</sup>, Babushkina N.P.<sup>1</sup>, Kolokolova O.V.<sup>2</sup>, Lipaenkova O.N.<sup>3</sup>, Puzyrev V.P.<sup>1</sup>, Freidin M.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia, e-mail: anna-garaeva@medgenetics.ru

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

<sup>3</sup> Tuberculosis hospital, Tomsk, Russia

Tuberculosis (TB) is a global health problem, both in the world and in our country, especially in the Siberia and the Far East. Well known that there are genetic factors that influence to TB predisposition. The aim of this work was studying the role of IL-12 / IFN- $\gamma$  gene polymorphisms in the development of different clinical forms of TB. The study was conducted in a population of russians in Tomsk: TB patients (n = 331) and healthy donors (n = 279). Patients were divided into subgroups: patients with primary (n = 61) and secondary (n = 270) TB. As well as patients with infiltrative (n = 155) and disseminated (n = 68) TB. The effect of allele A and genotype AA of the *STAT1* gene on the development of secondary TB (p = 0.0097) was shown. Also, the association of the C allele of the *IL12RB1* gene and the CC genotype with the development of infiltrative TB has been identified. Our results suggest differences in genetic predisposition to various forms of TB.

**Key words:** tuberculosis, polymorphism, genetic susceptibility, syndrome of atypical family mycobacteriosis.

### Введение

Туберкулез (ТБ) является актуальной мировой проблемой: в 1991 году ВОЗ объявило эту инфекцию глобальной проблемой здравоохранения [1]. Несмотря на совершенствование профилактических и терапевтических мер, в мире ежегодно, по разным оценкам, регистрируется от 8 до 10 миллионов новых случаев заболевания, а смертность от ТБ и его осложнений достигает 2 миллионов случаев. Эпидемиологические показатели в нашей стране в последние годы стабилизировались, однако все еще высоки: заболеваемость всеми формами ТБ с 2013 г. составила 63,0 на 100 тыс., в 2014 — 59,6 на 100 тыс. [2, 3].

Одной из отличительных особенностей ТБ является его клинический полиморфизм. Примерно 30% мирового населения инфицировано *M. tuberculosis*; но только в 5—10% случаев инфицирование ведет к развитию активного ТБ в течение двух лет после инфицирования без/или после короткой латентной фазы (первичный ТБ) [4]. Первичный ТБ характерен для детей, протекает остро и часто ассоциирован с внелегочными поражениями, возникающими вследствие гематогенного распространения микобактерии [5]. У большинства инфицированных развивается латентная инфекция без клинических и рентгенологических признаков заболевания [6].

В 90—95% случаев латентное носительство не переходит в активную фазу до конца жизни, однако у оставшихся 5—10% носителей позднее появляются клинические признаки заболевания (вторичный ТБ) [7].

Установлен вклад генетических факторов в развитие ТБ: уровень конкордантности по ТБ у монозиготных близнецов значительно выше, чем у дизиготных [8]. В контексте исследования генетических факторов, играющих ключевую роль в патогенезе ТБ, важное место отводят генам иммунного ответа. Их функционирование определяет адекватность иммунного ответа на внедрение патогена и способность к его элиминации из организма. С этой точки зрения для исследования представляют интерес пациенты, неспособные к развитию адекватной иммунной реакции не только в ответ на *M. tuberculosis*, но и к менее патогенным видам микобактерий окружающей среды, не вызывающим в норме патологических реакций. Это явление получило название синдрома атипичных семейных микобактериозов, оно было описано в качестве отдельной нозологии в 1951 году и характеризовалось локальными или разлитыми воспалительными реакциями после БЦЖ-вакцинации, заканчивающимися часто летально [9]. Установлено, что к данному патологическому состоянию приводят мутации в 6 генах (*IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1* и *NEMO*), контролирующими функционирование системы IL-12/IFN- $\gamma$ , критически важной для Th1-опосредованного иммунного ответа. Кроме того, предполагается, что мутации и полиморфные варианты в тех же генах могут вносить вклад в развитие восприимчивости к ТБ у взрослых.

Целью настоящей работы было изучение роли полиморфизмов генов атипичных семейных микобактериозов системы IL-12/IFN- $\gamma$  в развитии различных клинических форм ТБ.

### Материал и методы

Исследованы полиморфные варианты, выявленные в ходе работы по изучению синдрома атипичных семейных микобактериозов [10]. В гене *IL12RB1* рассмотрены следующие варианты: rs11575934, rs401502, rs12461312, rs17882555, rs3746190; в гене *IFNGR1* — rs2234711, rs7749390, rs17181457; в *STAT1* — rs2066797.

Материалом для исследования послужила выборка, сформированная из банка ДНК НИИ медицинской генетики. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП НИИ медицинской генетики ФГБНУ Томский НИМЦ РАН «Медицинская геномика». В контрольной группе ( $n = 279$ ) средний возраст  $\pm$  S.D. составил  $45,4 \pm 21,7$  года. Среди индивидов контрольной группы — 208 лиц женского пола ( $45,4 \pm 21,7$  года) и 71 — мужского ( $45,7 \pm 21,8$  года). Группу больных ТБ составил 331 чел. ( $31,7 \pm 15,4$  года); из них 113 женщин ( $31,5 \pm 15,4$  года) и 218 мужчин ( $31,9 \pm 15,3$  года). Основными критериями отбора для

исследования были три условия: наличие диагноза *туберкулез* (различные формы) для пациентов и отсутствие заболевания — для здоровых доноров; отсутствие родственных связей между индивидами; этническая принадлежность (русские).

Для более детального изучения предрасположенности к развитию различных форм ТБ группа больных была разделена на подгруппы, исходя из периода инфекции: больные с первичным ( $n = 61$ ) и вторичным ( $n = 270$ ) ТБ. Также в группе больных ТБ были выделены подгруппы, исходя из клинической формы ТБ. Наиболее представлены были пациенты с инфильтративной ( $n = 155$ ) и диссеминированной формами ( $n = 68$ ) заболевания. Больные с другими клиническими формами ТБ были малочисленны, и их выделение в отдельные подгруппы было нецелесообразно.

Генотипирование осуществлялось с использованием ПЦР-ПДРФ-анализа. Структура использованных для этого праймеров и параметры температуры описаны нами ранее [10].

Полученные частоты генотипов проверялись на соответствие ожидаемым при равновесии Харди—Вайберга с помощью точного теста Фишера [11]. Анализ ассоциации исследуемых вариантов с ТБ проводился путем сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов с использованием критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность. При численности генотипов менее 5 использовался точный тест Фишера. О степени ассоциации различных аллелей и генотипов с заболеванием судили по величине отношения шансов (OR) [12].

### Результаты и обсуждение

Частоты аллелей и генотипов всех изученных в настоящем исследовании полиморфизмов соответствовали ожидаемым при равновесии Харди—Вайнберга. Сравнение распределения частот аллелей и генотипов исследованных полиморфизмов генов *IL12B*, *IL12RB1*, *IFNGR1* не выявило значимых различий между группами больных ТБ и здоровыми донорами. Стоит отметить, что SNP в этих генах ранее уже изучены в свете предрасположенности к ТБ в различных популяциях, причем полученные данные весьма противоречивы. Например, у японцев острова Куиши варианты rs11575934 и rs401502 гена *IL12RB* были ассоциированы с развитием ТБ [13]. Однако это не подтвердилось в Марокко, Индонезии и Корее [14, 15, 16]. Полиморфизмы rs2234711 и rs7749390 гена *IFNGR1* тоже изучались относительно ТБ. Одни исследователи описывают отсутствие их ассоциации с развитием ТБ в Гамбии [17], Вьетнаме [18] и Японии [19]; другие описывают ассоциацию с ТБ в Китае [20, 21], Западной Африке [22] и Уганде [23].

В настоящем исследовании статистически значимые различия частот аллелей и генотипов установлены для rs2066797 гена *STAT1* ( $p = 0,005$ ) (таблица). При расчете

отношения шансов получены данные, свидетельствующие об ассоциации частого аллеля А и генотипа АА с развитием ТБ (OR = 2,18; 0,95% CI: 1,22–3,93; p = 0,0046 и OR = 2,34; 0,95% CI: 1,27–4,35; p = 0,0032 для аллеля А и генотипа АА соответственно).

При сравнении отдельных групп пациентов с учетом периода инфицирования (первичный и вторичный) с контрольной группой установлены статистически значимые различия частот аллелей и генотипов rs2066797 гена *STAT1* у пациентов с вторичным ТБ (p = 0,0097) (таблица). При сравнении группы с первичным ТБ с контрольной группой для этого же полиморфизма не

показано статистически значимых различий (p = 0,056). При расчете отношения шансов показано, что частый аллель rs2066797\*А и генотип АА повышают риск развития вторичного ТБ (OR = 2,22; 0,95% CI: 1,19–4,17; p = 0,0068 и OR = 2,26; 0,95% CI: 1,18–4,35; p = 0,0074 для аллеля и генотипа соответственно).

Продукт гена *STAT1* выполняет ключевую функцию в активации клеточно-опосредованного иммунного ответа. Активируется *STAT1* в ответ на присоединение IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha/\beta$  к клеточным рецепторам, участвуя в передаче сигнала внутри клетки и активации транскрипции генов иммунного ответа. Полиморфный вари-

Таблица

## Частоты аллелей и генотипов при сравнении больных туберкулезом и контрольной группы

Ген (полиморфизм)	Генотип / Аллель	Группы сравнения, n (%)		Период инфекции, n(%)		Формы ТБ, n (%)	
		Больные ТБ	Контроль	Первичный ТБ	Вторичный ТБ	Инfiltrативный ТБ	Диссеминированный ТБ
<i>IL12RB1</i> (rs11575934)	AA	134 (43,51)	103 (40,87)	29 (47,54)	105 (40,86)	59 (41,84)	26 (41,27)
	AG	138 (44,81)	126 (50,00)	24 (39,34)	114 (44,36)	63 (44,68)	32 (50,79)
	GG	36 (11,69)	23 (9,13)	8 (13,11)	38 (14,79)	19 (13,48)	5 (7,94)
	G	34,1	34,13	32,8	37,0	35,82	33,3
$\chi^2$ (p)*		1,884 (0,390)		2,470 (0,291)	4,259 (0,119)	2,152 (0,341)	0,089 (0,957)
$\chi^2$ (p)#		0,003 (0,960)		0,030 (0,862)	0,775 (0,379)	0,159 (0,690)	0,004 (0,950)
<i>IL12RB1</i> (rs17882555)	TT	57 (19,06)	50 (21,37)	10 (17,86)	47 (19,34)	55 (39,29)	14 (28,00)
	TC	132 (44,15)	112 (47,86)	29 (51,79)	103 (42,39)	57 (40,71)	23 (46,00)
	CC	110 (36,79)	72 (30,77)	17 (30,36)	93 (38,27)	28 (20,00)	13 (26,00)
	T	41,0	47,8	43,8	40,5	59,6	51,0
$\chi^2$ (p)*		2,136 (0,344)		0,415 (0,813)	2,974 (0,226)	<b>14,801 (0,001)</b>	1,147 (0,563)
$\chi^2$ (p)#		1,690 (0,194)		0,036 (0,849)	2,019 (0,155)	<b>13,852 (0,0002)</b>	0,860 (0,354)
<i>IL12RB1</i> (rs401502)	CC	33 (11,38)	23 (9,70)	5 (9,62)	28 (11,76)	20 (14,71)	5 (8,62)
	CG	122 (42,07)	104 (43,88)	23 (44,23)	99 (41,60)	53 (38,97)	28 (48,28)
	GG	135 (46,55)	110 (46,41)	24 (46,15)	111 (46,64)	63 (46,32)	25 (43,10)
	C	32,4	31,6	31,7	32,6	34,2	32,8
$\chi^2$ (p)*		0,445 (0,801)		0,002 (0,999)	0,616 (0,735)	2,370 (0,306)	0,370 (0,831)
$\chi^2$ (p)#		0,040 (0,842)		0,010 (0,921)	0,054 (0,815)	0,401 (0,527)	0,014 (0,905)
<i>IL12RB1</i> (rs3746190)	CC	118 (35,87)	80 (32,92)	19 (31,67)	99 (36,94)	59 (38,06)	24 (35,82)
	CT	154 (46,81)	117 (48,15)	28 (46,67)	125 (46,64)	71 (45,81)	29 (43,28)
	TT	57 (17,33)	46 (18,93)	13 (21,67)	44 (16,42)	25 (16,13)	14 (20,90)
	T	40,7	42,7	45,0	39,7	39,0	42,5
$\chi^2$ (p)*		0,603 (0,740)		0,230 (0,891)	0,105 (0,575)	1,243 (0,537)	0,500 (0,779)
$\chi^2$ (p)#		0,505 (0,477)		0,085 (0,770)	0,990 (0,320)	1,072 (0,300)	0,000 (0,998)
<i>IL12RB1</i> (rs12461312)	GG	96 (30,48)	74 (30,45)	18 (30,00)	79 (30,86)	48 (32,00)	16 (26,23)
	TG	155 (49,21)	124 (51,03)	31 (51,67)	124 (48,44)	69 (46,00)	31 (50,82)
	TT	64 (20,32)	45 (18,52)	11 (18,33)	53 (20,70)	33 (22,00)	14 (22,95)
	T	44,9	44,0	44,1	44,9	45,0	48,4
$\chi^2$ (p)*		0,318 (0,853)		0,008 (0,996)	0,487 (0,787)	1,116 (0,572)	0,778 (0,674)
$\chi^2$ (p)#		0,055 (0,814)		0,006 (0,939)	0,048 (0,827)	0,037 (0,848)	0,574 (0,449)

Ген (полиморфизм)	Генотип / Аллель	Группы сравнения, n (%)		Период инфекции, n(%)		Формы ТБ, n (%)	
		Больные ТБ	Контроль	Первичный ТБ	Вторичный ТБ	Инфильтративный ТБ	Диссеминированный ТБ
<i>STAT1</i> (rs2066797)	AA	250 (91,91)	192 (84,21)	44 (95,62)	205 (92,34)	116 (89,23)	48 (90,57)
	AG	19 (7,72)	35 (15,35)	2 (4,26)	17 (7,66)	14 (10,77)	5 (9,43)
	GG	1 (0,37)	1 (0,44)	1 (2,13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	G	4,2	8,1	4,26	3,8	5,4	4,7
p (по точному тесту Фишера)*		0,0053		0,0562	0,0097	0,3579	0,4989
p (по точному тесту Фишера) #		0,0062		0,2086	0,0074	0,1787	0,3057
<i>IFNGR1</i> (rs2234711)	CC	47 (16,73)	51 (20,40)	8 (17,39)	39 (16,67)	28 (20,00)	10 (17,86)
	TC	149 (53,02)	117 (46,80)	20 (43,48)	127 (54,27)	76 (54,29)	32 (57,14)
	TT	85 (30,25)	82 (32,80)	18 (39,13)	68 (29,06)	36 (25,71)	14 (25,00)
	C	43,2	43,8	39,1	43,8	47,1	46,43
$\chi^2$ (p)*		2,265 (0,322)		0,481 (0,786)	2,791 (0,002)	2,512 (0,285)	2,041 (0,360)
$\chi^2$ (p)#		0,015 (0,903)		0,093 (0,761)	0,004 (0,949)	0,681 (0,409)	0,161 (0,688)
<i>IFNGR1</i> (rs7749390)	AA	70 (30,04)	82 (35,19)	15 (34,09)	55 (29,10)	31 (26,72)	13 (25,49)
	AG	111 (47,64)	110 (47,21)	20 (45,45)	91 (48,15)	57 (49,14)	28 (54,90)
	GG	52 (22,32)	41 (17,60)	9 (20,45)	43 (22,75)	28 (24,14)	10 (19,61)
	G	46,1	41,2	43,2	46,8	48,7	47,1
$\chi^2$ (p)*		2,394 (0,302)		0,183 (0,913)	2,648 (0,266)	3,452 (0,178)	1,781 (0,410)
$\chi^2$ (p)#		2,230 (0,135)		0,058 (0,810)	2,519 (0,113)	3,248 (0,072)	0,949 (0,330)
<i>IFNGR1</i> (rs17181457)	CC	241 (86,07)	225 (91,09)	40 (81,63)	201 (87,01)	106 (84,13)	54 (88,52)
	CT	38 (13,57)	20 (8,10)	9 (18,35)	29 (12,55)	19 (15,08)	7 (11,48)
	TT	1 (0,36)	2 (0,81)	0 (0)	1 (0,43)	1 (0,79)	0 (0)
	T	7,1	4,9	9,2	6,7	8,3	5,7
p (по точному тесту Фишера)*		0,0730		0,0828	0,2459	0,1050	0,6460
p (по точному тесту Фишера) #		0,1547		0,0941	0,2662	0,730	0,8171

Примечание.  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность; p — p-значение для оценки статистической значимости различий; \* — при сравнении генотипов; # — при сравнении аллелей; сравнение первичного и вторичного, а также инфильтративного и диссеминированного ТБ проведено с группой контроля.

ант rs2066797 расположен в девятом интроне гена, может влиять на функционирование гена, его экспрессию, активность белкового продукта [10]. С учетом влияния данного белка на IFN- $\gamma$ - и IFN- $\alpha/\beta$ -опосредованный иммунный ответ, гомозиготы по мутациям гена *STAT1* могут быть чувствительны не только к инфекциям, вызванным внутриклеточными патогенами (микобактериями), но и к вирусам (вирус простого герпеса-1, вирус Эпштейна—Барр) [24]. Инфекции у них протекают крайне тяжело и заканчиваются летальным исходом [25].

В настоящей работе также проведена оценка распространенности аллелей и генотипов исследуемых генов у пациентов с отдельными клиническими формами ТБ (инфильтративный и диссеминированный ТБ). Установлены значимые различия частот аллелей и генотипов rs17882555 гена *IL12RB1* при сравнении больных инфильтративной формой ТБ с контрольной группой ( $\chi^2 = 13,852$ ;  $p < 0,001$  и  $\chi^2 = 14,801$ ;  $p = 0,001$  для аллелей и генотипов соответственно). Носительство аллеля rs17882555\*Т и генотипа ТТ снижает риск развития инфильтративного ТБ (OR = 0,56; 0,95% CI: 0,41—0,77;



$p = 0,0001$  и  $OR = 0,56$ ;  $0,95\% CI: 0,33-0,95$ ;  $p = 0,0227$  для аллеля и генотипа соответственно). В патогенезе инфильтративного ТБ наиболее выражен экссудативный компонент воспаления, лежащий в основе формирования клинической картины. Ранее уже были получены результаты для полиморфизма гена этанол-индуцированного цитохрома р450 (*CYP2E1*), указывающие на генетическую особенность развития инфильтративного ТБ [26].

Полиморфный вариант rs17882555 (с.1983+24C>T) расположен в сайте сплайсинга в тринадцатом интроне гена *IL12RB1*. Следовательно, замена в данной позиции может влиять на сплайсинг конечного белкового продукта гена — рецепторной субъединицы IL12-Rβ1, опосредованно влияя на конфигурацию молекулы зрелого белка и, возможно, ее функциональную активность. Кроме того, в данном регионе также расположен сайт связывания с фактором транскрипции TAL1, участвующим во внутриклеточной сигнализации лимфоцитов. Субъединица IL12-Rβ1 является частью рецептора для IL-12, необходимой для реализации его основного иммунологического эффекта — выработки IFN-γ, необходимого для повышения цитотоксичности макрофагов и завершения фагоцитоза *M. tuberculosis*. Мутации в данном гене приводят к отсутствию экспрессии рецепторной субъединицы на поверхности активированных Т- и НК-клеток или нарушению его структуры, что приводит к неспособности клеток вырабатывать IFN-γ в адекватном количестве. Пациенты с такими дефектами демонстрируют самые разнообразные клинические проявления и исходы микобактериальной инфекции. Как предполагают исследователи, это может свидетельствовать о наличии пока неизвестных факторов организма-хозяина и/или патогена, модулирующих итоговый фенотип [14]. Необходимо отметить, что данный полиморфный вариант практически не исследован относительно развития ТБ, за исключением популяции в Марокко, в которой не показана его ассоциация с заболеванием [14].

### Заключение

Развитие туберкулезной инфекции характеризуется несколькими этапами и широким разнообразием клинических проявлений заболевания, между тем большинство генетических исследований подверженности ТБ выполнено без детализации на отдельные клинические фенотипы. Есть основания предполагать, что выявление генетических факторов в развитии клинических особенностей туберкулезной инфекции, чрезвычайно важно для понимания патогенеза заболевания и может быть полезно для определения в том числе исходов латентной туберкулезной инфекции, которая, как известно реактивируется лишь у 5–10% инфицированного микобактерией населения в большинстве случаев по пока не установленным причинам.

В настоящем исследовании впервые показана ассоциация полиморфного варианта (rs2066797) гена *STAT1* с развитием вторичной формы заболевания и варианта (rs17882555) гена *IL12RB1* с инфильтративным ТБ. На данном этапе только накапливаются экспериментальные данные в пользу гипотезы об особенностях развития и течения инфекционного процесса в зависимости от индивидуальных вариаций в геноме человека. Например, в результате репликации в Томской популяции SNP, обнаруженных в полногеномных ассоциативных исследованиях, установлена вовлеченность разных молекулярных механизмов в развитие различных стадий инфекционного процесса, а именно отдельные варианты в разных генах ассоциированы с первичным ТБ (rs6538140, rs40363, rs1934954) и вторичным ТБ (rs10956514, rs5928363) [27]. Таким образом, существует необходимость детального подхода к изучению генетических аспектов предрасположенности к ТБ и особенностей клинического проявления инфекционного процесса, что будет определять успех возможного дальнейшего использования геномных данных в медицинской практике.

### Список литературы

1. Lin PL, Flynn JAL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J. Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):15-22.
2. Шилова МВ. Взгляд на эпидемиологическую ситуацию с туберкулезом в российской федерации (в современных социально-экономических условиях). *Российский электронный журнал лучевой диагностики.* 2014;4(1):34-42.
3. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2014.* Geneva: WHO; 2014.
4. Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Phromjai J et al. Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis. *Genes and Immunity.* 2010 Jul;11(5):416-422.
5. Cruz AT, Starke RS. Clinical manifestations of tuberculosis in children. *Paediatr. Respir. Rev.* 2007 Jun;8(2):107-117.
6. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 Jul 13;12(8):581-591.
7. Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA et al. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014 May 12;369(1645):20130428.
8. Рудко АА, Пузырев ВП. Генетическая подверженность туберкулезу. *Генетика бронхолегочных заболеваний: под ред. ЛМ Огородовой, ВП Пузырева (Серия монографий Российского респираторного общества; Гл. ред. Серии Чучалин АГ).* — М.: Издательский холдинг «Атмосфера», 2010. С. 122 — 139.
9. Cottle LE. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Clin. Genet.* 2011 Jan;79(1):17-22.
10. Рудко АА, Гараева АФ, Брагина ЕЮ и др. Скрининг мутаций генов атипичных семейных микобактериозов. *Медицинская генетика.* 2013;(12):14-19.
11. Вейр Б. Анализ генетических данных: Пер. с англ. — М.: Мир, 1995. — 400 с.
12. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? *Int. J. Epidemiol.* 1993;26(6):1189-1192.
13. Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K et al. Influence of interleukin-12 receptor β1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum. Genet.* 2003 Mar;112(3):237-43.

14. Remus N, El Baghdadi J, Fieschi C et al. Association of *IL12RB1* polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *JID*. 2004 Aug 1;190(3):580-587.
15. Lee HW, Lee HS, Kim DK et al. Lack of an association between interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 polymorphisms and tuberculosis in Koreans. *Respiration*. 2005 Jul-Aug;72(4):365-8
16. Sahiratmadja E, Baak-Pablo R, de Visser AW et al. Association of polymorphisms in IL-12/IFN- $\gamma$  pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tuberculosis*. 2007 Jul;87(4):303-311.
17. Awomoyi AA, Nejentsev S, Richardson A et al. No association between interferon- $\gamma$  receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. *Thorax*. 2004 Apr;59(4):291-594.
18. Hijikata M, Shojima J, Matsushita I et al. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Hum. Genet*. 2012 May;131(5):675-82.
19. Kusuhara K, Yamamoto K, Okada K et al. Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes. *Int. J. Immunogenetics*. 2007 Feb;34(1):35-44.
20. He J, Wang J, Lei D et al. Analysis of functional SNP in *Ifng?Ifngr1* in chinese Han population with tuberculosis. 2010 Jun;71(6):452-458.
21. Ли J, Pan H, Chen Y et al. Genetic polymorphisms of *IFHG* and *IFNGR1* in association with the risk of pulmonary tuberculosis. *Gene*. 2014 Jun 10;543(1):140-144.
22. Cooke GS, Campbell SJ, Sillah J et al. Polymorphism within the Interferon- $\gamma$ /Receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 2006 Aug 1;174(3):339-343.
23. Stein CM, Zalwango S, Chiunda AB et al. Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNFa cytokine expression: evidence for association with *IFNGR1*, *IL-10*, and *TNF* receptor 1 genes. *Hum. Genet*. 2007 Jul;121(6):663-673.
24. Chaggier A, Kong XF, Boisson-Dupuis S et al. A partial form of recessive *STAT1* deficiency in humans. *J. Clin. Invest*. 2009 Jun;119(6):1502-1514.
25. Chaggier A, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E et al. Novel *STAT1* alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet*. 2006 Aug 18;2(8):e131.
26. Bikmaeva AR, Sibiryak SV, Khusnutdinova EK. Insertion Polymorphism of the *CYP2E1* gene in patients with infiltrative pulmonary tuberculosis from Bashkortostan. *Molecular Biology*. 2004;38(2):196-199.
27. Garaeva AF, Babushkina NP, Rudko AA et al. Differential genetic background of primary and secondary tuberculosis in Russians. *Meta Gene*. 2017;11:178-180.

# Молекулярные причины прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии у российских пациентов

Сермягина И.Г., Баязутдинова Г.М., Браславская С.И., Логинова А.Н.,  
Ряднинская Н.В., Чухрова А.Л., Шагина О.А., Поляков А.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва 115478 ул. Москворечье, д. 1. факс (495) 324 8110, e-mail: sirina74@mail.ru

Фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая (ФОП, FOP, MIM 135100) — редкое аутосомно-доминантное наследственное заболевание (частота 1:2000000), характеризующееся врожденной костной патологией и прогрессирующим гетеротопическим окостенением мягких тканей больного. Патологический процесс имеет непредсказуемый прогрессирующий характер с возникновением новых костных образований. Формирование патологических оссификатов происходит в различных частях тела, в местах травмирования мышечной и соединительной ткани. За развитие ФОП ответственны мутации, возникающие в гене *ACVR1*. Немногочисленные работы в российской научной литературе, посвящены клиническим признакам и особенностям течения ФОП. Целью данного исследования является обобщение результатов, полученных в результате проведения ДНК-диагностики ФОП у российских пациентов. Результаты молекулярно-генетического исследования причин возникновения ФОП в России представлены впервые. В лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра с 2009 года проводится поиск мутаций в гене *ACVR1*. Молекулярную причину заболевания удалось установить у 28 из 72 обследованных неродственных пробандов.

**Ключевые слова:** фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая, ФОП, *ACVR1*.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## The molecular reasons for the Fibrodysplasia ossificans progressiva in the Russian patients

Sermyagina I.G., Bayazutdinova G.M., Braslavskaia S.I., Loginova A.N.,  
Ryadninskaya N.V., Schagina O.A., Poliakov A.V.

Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russia, e-mail: sirina74@mail.ru

Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP, FOP, MIM 135100) [1] is a rare autosomal dominant hereditary disease (frequency 1:2000000), characterized by congenital bone disease and progressive heterotopic ossification of the patient's soft tissues. The pathological process is unpredictable and progressive, with new bone formations. Pathological ossification occurs in different parts of the body, in the area of muscle damage and connective tissue. The development of fibrodysplasia occurs as a result of a mutation in the *ACVR1* gene. Several works in the Russian scientific literature show the clinical signs and characteristics of fibrodysplasia ossificans progressiva. Objective of this research is generalization of the results received as a result of performing DNA diagnostics of FOP at the Russian patients. The results of molecular-genetic analysis of the causes of FOP in Russia are presented for the first time. Searching of mutations in *ACVR1* gene is carried out to laboratories of DNA diagnostics Medical Genetics Research Center since 2009. The molecular cause of the disease was found in 28 of 72 unrelated probands.

**Key words:** Fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP, *ACVR1*.

### Введение

Фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая (ФОП, FOP, MIM 135100) — редкое наследственное заболевание (частота 1:2000000), характеризующееся генетически обусловленной гетеротопической оссификацией мягких тканей больного [1]. ФОП наследуется аутосомно-доминантно с полной пенетрантностью. В литературных источниках отсутствует информация о преобладании данной патологии у определенных этнических групп [2]. В основном встречаются спорадические случаи данной болезни, однако имеются и редкие описания семейных случаев ФОП [3].

Манифестация болезни происходит, как правило, в раннем детском возрасте. Однако, известны случаи

позднего возникновения первых проявлений ФОП. Для фенотипа пациентов, наряду с оссификатами и костными аномалиями, специфично наличие «маркерной» врожденной микродактилии больших пальцев ног. При формировании дополнительной кости вначале отмечается уплотнение и воспаление пораженного участка ткани, что отличает патологическую оссификацию от естественной. Течение патологического процесса имеет непредсказуемый, неуклонно прогрессирующий характер с чередованием «вспышек» возникновения костных образований. Формирование дополнительной патологической костной ткани происходит в различных частях тела в местах травмирования мышечной и соединительной ткани. Как правило, первыми страдают мышцы шеи и спины с последующим распространением патологиче-

ского процесса на другие части тела. У больных с ФОРП дополнительные кости могут формироваться в суставах и приводить к нарушениям подвижности опорно-двигательного аппарата, глубокой инвалидизации больных, вплоть до полного обездвиживания. В случаях, когда в патологический процесс вовлекаются жевательные мышцы, нарушается способность нормально принимать пищу. Попытки хирургического удаления оссификатов, как правило, запускают новую волну патологического процесса. При данном заболевании категорически противопоказаны любые оперативные вмешательства [4]. На сегодняшний день кроме симптоматической терапии активно разрабатывается патогенетическая медикаментозная терапия ФОРП с использованием агонистов рецептора ретиноевой кислоты (RAR $\alpha$ ) и проводятся клинические испытания препарата, способного предотвратить патологическую посттравматическую оссификацию. Препарат Palovarotene разработанный Clementia Pharmaceuticals успешно прошел вторую фазу клинических испытаний и уже зарегистрирован, как орфанный препарат в США [5, 6].

За развитие данного патологического состояния ответственны мутации, возникающие в гене, кодирующем рецептор ACVR1 (Activine A Receptor type I, также известный как ALK-2), который относится к семейству BMP-рецепторов (bone morphogenetic protein). Ген ACVR1 был картирован Shore с соавторами [7] в 2006 году в локусе 2q23-q24. Он состоит из 11 экзонов. Первые два экзона являются некодирующими. Регуляторный белок участвует в процессе эмбрионального формирования костной ткани и постнатальной репарации костей скелета [6]. Белок ACVR1 состоит из 509 аминокислот.

Ввиду редкости данного заболевания в российской научной литературе имеются немногочисленные работы, посвященные клиническим признакам и особенностям течения ФОРП [8–11]. В лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра с 2009 года проводится поиск мутаций в гене ACVR1. Целью данного исследования является обобщение результатов, полученных в результате ДНК-диагностики ФОРП у российских пациентов. В данной работе впервые в России представлены данные о молекулярно-генетических причинах ФОРП, полученные на максимально возможной

для нашей страны, с учетом редкости данной болезни, выборке больных и членов их семей.

### Материалы и методы исследования

С 2009 по 2017 гг. нами собраны образцы 72 неродственных больных с клиническим диагнозом ФОРП из различных российских регионов. В исследуемой выборке были представлены пациенты обоих полов. Расовая и этническая принадлежность не определялась. Возраст больных на момент проведения молекулярно-генетического анализа варьировал от 2 до 30 лет. В нескольких случаях при выявлении у пациента мутации в гене ACVR1 по инициативе родителей были исследованы образцы ДНК членов семьи.

Образцы геномной ДНК получены из венозной крови пациентов с использованием наборов для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, WI, USA) и DAtomTM DNA Prep 200, согласно протоколам производителя. Для поиска мутаций в гене ACVR1 использованы пары праймеров, выбранные в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ и синтезированные в НПФ «Литех». Одиннадцать амплифицируемых фрагментов включают в себя нуклеотидную последовательность и прилегающие интронные участки с 1 по 11 экзоны гена ACVR1. Амплификация необходимых фрагментов ДНК проводилась методом полимеразной цепной реакции на программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия). Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов ДНК проводилось методом Сенгера с использованием набора для секвенирования и протокола фирмы производителя на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

### Результаты и обсуждение

В результате исследования всей кодирующей последовательности и прилежащих интронных областей гена ACVR1 причину заболевания удалось установить у 28 из 72 обследованных неродственных пробандов. Спектр выявленных у российских больных мутаций представлен в таблице.

Таблица

Спектр выявленных мутаций в гене ACVR1 у российских больных с ФОРП

Экзон	Замена нуклеотида	Белок	Количество
6	c.617G>A	p.Arg206His	23
6	c.619C>G	p.Gln207Glu	1
8	c.974G>C	p.Gly325Ala	1
8	c.982G>A	p.Gly328Arg	1
8	c.983G>A	p.Gly328Glu	1
9	c.1067G>A	p.Gly356Asp	1

Как видно из таблицы, в 23 случаях была выявлена самая частая и первая описанная мутация в гене *ACVR1* с.617G>A (p.Arg206His), локализованная в экзоне 6. По данным мировых исследований, данная патологическая замена выявляется более чем у 90% больных с клиническим диагнозом *фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая* [12]. В пяти других случаях найдены ранее описанные в научной литературе и генетических базах миссенс-мутации с.619C>G (p.Gln207Glu) в экзоне 6, с.974G>C (p.Gly325Ala), с.982G>A (p.Gly328Arg), с.983G>A (p.Gly328Glu) в экзоне 8 и с.1067G>A (p.Gly356Asp) в экзоне 9 гена *ACVR1* [13, 14].

Все выявленные мутации возникли в экзонах, входящих в «горячую» область гена. Накопленные литературные данные позволяют выделить регион гена *ACVR1*, в котором описано наибольшее количество мутаций. Данный регион включает в себя 6, 7, 8 и 9 экзоны и соответствует двум функционально важным участкам в структуре белка *ACVR1*: GS-домену и домену протеинкиназы (рис. 1). На данный момент в базе мутаций человека HGMD зарегистрировано всего 17 миссенс-мутаций и одна делеция [15].

В результате однонуклеотидной замены с.617G>A в экзоне 6 гена *ACVR1* происходит замещение аргинина на гистидин в кодоне 206 в глицин-серин богатом домене рецептора. Эта аминокислотная замена приводит к конформационному изменению рецептора, что нарушает взаимодействие со специфическим ингибитором FKBP12, который в норме ограничивает его повышенную активность. Неконтролируемая активация рецептора вызывает развитие патологического формирования костной ткани. В международной литературе мутация p.Arg206His признается одной из самых патогенных, приводящей к поистине катастрофическим последствиям для пораженного организма [16, 17]. В результате возникновения данной замены развивается классическая форма ФОП. Для мутаций в других точках гена описаны различные варианты клинической картины [18].

В России, как и во всем мире, наиболее частой является мутация p.Arg206His, на долю которой в нашей выборке приходится 82% (рис. 2).

В трех семьях были исследованы образцы ДНК родителей больных ФОП с целью определения природы возникновения мутации. Установлено, что в двух семьях мутация возникла *de novo*. В одной из семей с мутацией p.Arg206His для исследования был доступен биологический материал матери и родного сибса пробанда. У брата пробанда был выявлен тот же патогенный вариант нуклеотидной последовательности, что и у больного. К сожалению, мы не располагаем биологическим материалом и объективной информацией о клиническом статусе биологического отца больных детей, поэтому не можем установить, что явилось причиной передачи мутации двум детям в семье: болезнь отца или герминальный мозаицизм одного из родителей.

Недостаточные данные о клинической картине заболевания у прошедших ДНК-диагностику в нашей лабо-

ратории пациентов не позволяют подтвердить литературные наблюдения о взаимосвязи положения мутации и патологических проявлений ФОП.

Установлено, что причиной возникновения ФОП у больных в России являются мутации гена *ACVR1*. Мутации данного гена выявлены у 40% обследованных пробандов. Столь низкий процент выявляемости мутаций в обследованной группе российских больных, по-видимому, связан с низкой осведомленностью врачей различных специальностей о клинических и генетических особенностях данной патологии. Это, возможно, приводит к избыточной диагностике ФОП на клиническом этапе обследования пациентов.

На клиническом этапе обследования ФОП необходимо дифференцировать с различными вариантами патологии: врожденными аномалиями скелета, прогрессирующей оссифицирующей гетероплазией, с доброкачественными и злокачественными новообразованиями костной системы. Такой перечень дифференциальных диагнозов может приводить к продолжительным многочисленным консультациям с применением различных инвазивных процедур, которые крайне опасны для больных ФОП, так как могут привести к возникновению новых очагов оссификации. Учитывая, с одной стороны, вариабельность клинических проявлений ФОП, а с другой — наличие мажорной мутации, облегчающей проведение ДНК-диагностики, молекулярно-генетический анализ гена *ACVR1* имеет решающее значение в дифференциальной диагностике и окончательной верификации диагноза ФОП. Быстрота, безопасность, относительная доступность для жителей различных регионов РФ, позволяют рассматривать молекулярно-генетический анализ как один из первоочередных этапов обследования пациентов с подозрением на это заболевание.

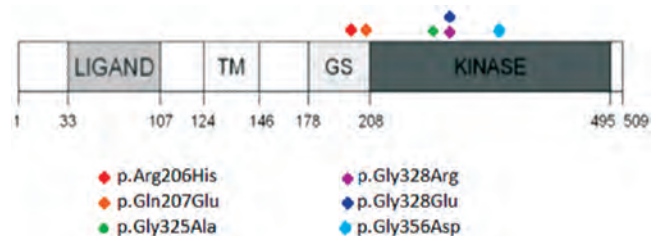


Рис. 1. Распределение мутаций на схеме доменной организации белка *ACVR1*.

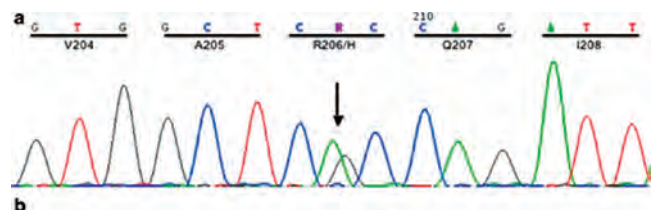


Рис. 2. Мутация p.Arg206His в экзоне 6 гена *ACVR1*.

## Список литературы

1. OMIM: Mendelian Inheritance in Man. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>].
2. Kaplan F.S., Le Merrer M., Glaser D.L., Pignolo R.J., Goldsby R., Kitterman J.A., Groppe J., Shore E.M. Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Practice & Research // Clinical Rheumatology*. 2008. Vol. 22. P. 191-205.
3. Hebel N., Shore E.M., Kaplan F.S. Three pairs of monozygotic twins with fibrodysplasia ossificans progressiva: the role of environment in the progression of heterotopic ossification // *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2005. Vol. 3. P. 205-208.
4. Коваленко-Клычкова Н.А., Клычкова И.Ю., Кенис В.М., Мельченко Е.В. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия у детей (обзор литературы и анализ 5 клинических случаев) // *Травматология и ортопедия России*. 2014. №1. С. 102-109.
5. Chakkalakal et al. Palovarotene Inhibits Heterotopic Ossification and Maintains Limb Mobility and Growth in Mice with the Human ACVR1 R206H Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Mutation. *J Bone Miner Res*. 2016.
6. Clementia Announces Top-line Results from Phase 2 Trial of Palovarotene for Treatment of Patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Clementia Pharma. Retrieved 2016.10.14 [www.clementiapharma.com](http://www.clementiapharma.com).
7. Shore E.M., Xu M., Feldman G.J., et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva // *Nature Genet*. 2006. Vol. 38. P. 525-527.
8. Антелава О.А., Никишина И.П., Гусева И.А., Мякоткин В.А., Хелковская-Сергеева А.Н., Насонов Е.Л., Раденска-Лоповок С.Г. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия // *РМЖ*. 2015. №7. С. 415
9. Антелава О.А., Лобжанидзе Т.Б., Никишина И.П., Фёдоров Е.С., Бельская Е.А., Хитров А.Н. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия // *РМЖ*. 2005. №8. С. 560
10. Рябова Т.В., Баяндина Г.Н., Утюшева М.Г., Геппе Н.А. и др. Прогрессирующий оссифицирующий полимиозит у детей. В кн.: *Сложный больной в практике педиатра-ревматолога*. М.: МИА. 2008. С. 86-104.
11. Рябова Т.В., Геппе Н.А., Михалева Г.В., Сермягина И.Г. Клинические и рентгенологические проявления оссифицирующей прогрессирующей фибродисплазии у детей. // *Лечащий врач*. 2011. № 1. С. 31.
12. Huning I, Gillessen-Kaesbach G. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical course, genetic mutations and genotype-phenotype correlation. // *MolSyndromol*. 2014. 5(5). P. 201-1.
13. Koster B., Pauli R.M., Reardon W. et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. // *Hum. Mutat*. 2009. Vol. 303. P. 79-90.
14. Whyte MP, Wenkert D, Demertzis JL et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: middle-age onset of heterotopic ossification from a unique missense mutation (c.974G>C, p.G325A) in ACVR1. // *J Bone Miner Res*. 2012.27(3). P. 729-37.
15. База мутаций человека Human Gene Mutation Database [<http://www.hgmd.org>].
16. Kaplan FS, Chakkalakal SA, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. *DisModelMech*. 2012. 5 (6) P. 756-62.
17. Groppe JC, Wu J, Shore EM, Kaplan FS. In vitro analyses of the dysregulated R206H ALK2 kinase-FKBP12 interaction associated with heterotopic ossification in FOP. *CellsTissuesOrgans*. 2011. 194 (2-4). P. 291-295.
18. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS: Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet J RareDis*. 2011. 6. P.80-10.

# Влияние инактивации X-хромосомы на фенотипические проявления транслокаций X;аутосома

Толмачёва Е.Н., Скрябин Н.А., Сеитова Г.Н., Суханова Н.Н., Черемных А.Д., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.

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

Фенотипические проявления транслокаций X;аутосома, в отличие от транслокаций аутосома;аутосома, часто зависят от нескольких факторов: расположения точек разрыва на обеих хромосомах и особенностей инактивации X-хромосомы. Благодаря развитию молекулярно-цитогенетических и генетических методов в настоящее время мы можем более детально исследовать каждый конкретный случай таких транслокаций, что позволяет глубже понять причины проявления патологического фенотипа. Цель исследования — оценить влияние инактивации X-хромосомы на клинические проявления различных транслокаций X;аутосома. С использованием матричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH, 8x60K, Agilent Technologies) и метилчувствительной ПЦР проанализированы хромосомные мутации и уточнены точки разрыва, а также оценен характер инактивации X-хромосомы у трех пациенток женского пола с различными транслокациями X;аутосома. В случае несбалансированной транслокации 46,X,t(X;3)(p11.3;q21.3) инактивация X-хромосомы оказывает протективное действие на фенотип, тогда как сбалансированная транслокация 46,X,t(X;9)(q22;q13) у второй пациентки проявляется тяжелыми клиническими симптомами вследствие возможной частичной функциональной моносомии хромосомы 9. Кроме того, на фенотип пациентки может оказывать влияние дополнительная микроделеция, выявленная в субсегменте 22q11.22 методом aCGH. И, наконец, в случае, когда в транслокации 46,X,t(X;10)(p22.2;q11.2) задействован дистальный район короткого плеча X-хромосомы, процесс инактивации не связан с фенотипом пациента, так как регион Xp22.2 избегает инактивации. Для детального анализа фенотипических проявлений транслокаций X;аутосома необходим комплексный подход, включающий цитогенетические, молекулярно-цитогенетические методы анализа структуры хромосом и анализ характера инактивации X-хромосомы.

**Ключевые слова:** транслокация X;аутосома, инактивация X-хромосомы.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## Effect of X chromosome inactivation on phenotypic manifestations of translocations X;autosome

Tolmacheva E.N., Skryabin N.A., Seitova G.N., Sukhanova N.N., Cheremnykh A.D., Nazarenko L.P., Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

Phenotypic manifestations of X-chromosome;autosome translocations, in contrast to autosome;autosome translocations, often depend on several factors: the location of the break points on both chromosomes and the features of X-chromosome inactivation. Due to the development of molecular cytogenetic and genetic methods, at the present time we can investigate each specific case of such translocations in details, that allows us better understanding the causes of the pathological phenotype. The aim of the present study was evaluation the effect of the X-chromosome inactivation on the clinical manifestation of various X;autosome translocations. Break points and X-inactivation were assessed by array-CGH (8x60K, Agilent Technologies) and methyl-sensitive PCR at *AR* gene, respectively. Three cases of X;autosome translocations, the feature of X inactivation, and the clinical picture accompanying chromosomal rearrangement were analyzed. In the case of an unbalanced translocation 46,X,t(X;3)(p11.3;q21.3), the X-chromosome inactivation has a protective effect on the phenotype, whereas second patient with the balanced translocation 46,X,t(X;9)(q22;q13) exhibits severe clinical symptoms, possibly because of partial functional monosomy of the chromosome 9. Furthermore, the phenotype of the patient may be affected by the additional microdeletion that was found by aCGH at the 22q11.22. Finally, in the third case where the distal region of the short arm of the X chromosome is involved in the translocation 46,X,t(X;10)(p22.2;q11.2), the inactivation process is not associated with the patient phenotype, since the Xp22.2 region escape inactivation. For a detailed analysis of the phenotypic manifestations of the X;autosome translocations complex investigation with various molecular diagnostic methods is required, including cytogenetic, molecular cytogenetic methods for analyzing the structure of rearranged chromosomes, and the analysis of the X chromosome inactivation.

**Key words:** X;autosome translocation, X-chromosome inactivation.

## Введение

Инактивация X-хромосомы — эпигенетический процесс, который начинается в раннем эмбриогенезе у женщин и приводит к репрессии транскрипции большей части X-сцепленных генов на одном из гомологов. Инактивация X-хромосомы в норме происходит равновероятно, то есть примерно в половине клеток инактивируется отцовская, а в половине материнская X-хромосома. Отклонения от этого процесса встречаются, как правило, в результате летальных мутаций в X-сцепленных генах или хромосомных перестроек в X-хромосоме, когда происходит селекция клонов клеток с активной мутантной хромосомой. В случаях транслокаций X;аутосома, фенотипические последствия перестройки могут быть весьма разнообразными. Они зависят от размера перестройки, локализации точек разрыва, от того, сбалансированной или нет, является транслокация. Кроме того, фенотипические проявления хромосомной перестройки будут зависеть от особенностей инактивации X-хромосомы в каждом отдельном случае. Если перестройка произошла в регионе, избегающем инактивации, то фенотипические проявления будут сходными с любой транслокацией аутосома;аутосома, так как характер инактивации в этом случае никак не повлияет на клинические проявления. В случаях сбалансированной транслокации за счет инактивации перенесенного материала аутосомы может возникнуть функциональная моносомия в одном из клонов клеток. В этом случае селективное преимущество получает клон клеток с инактивированной нормальной X-хромосомой и будет наблюдаться асимметричная инактивация. Смещение характера инактивации может произойти и при несбалансированной транслокации, когда селективное преимущество появляется у клеток, имеющих активную нормальную X, а перестроенная хромосома инактивируется. В обоих случаях происходит компенсация хромосомной перестройки, и её клиническая манифестация значительно смягчается. Манифестация клинических признаков зависит также от размера перенесенного участка X-хромосомы на дериват аутосомы, так как может возникать частичная дисомия X-хромосомы из-за того, что этот участок не инактивируется [1].

До сих пор остается не ясным, как инактивируются аутосомные гены при транслокациях X;аутосома. В некоторых случаях показано, что инактивация аутосомных генов на деривате происходит избирательно, причем она не связана с присутствием в промоторе CpG-островков, другие же гены, напротив, избегают инактивации [2]. Такая же картина наблюдается в случаях, когда часть X-хромосомы, содержащая сегмент Xq13 с геном *XIST*, переносится на аутосому [3]. Каким образом отдельные аутосомные гены избегают инактивации и зависит ли этот феномен от конкретной хромосомной перестройки, еще не выяснено. В настоящей работе мы изучили характер инактивации X-хромосомы и фенотипические проявления у трех пациенток с различными вариантами транслокаций X;аутосома.

## Материал и методы

У двух пациенток женского пола в возрасте 9 месяцев и 16 лет с транслокациями X;аутосома, выявленными при стандартном цитогенетическом анализе, был проведен молекулярно-генетический анализ с использованием микрочипов Human Genome CGH Microarray Kits 8x60K (Agilent Technologies, США). Третья пациентка с цитогенетически выявленной транслокацией была обследована ранее путём микроматричного анализа с использованием микрочипа Affymetrix CytoScan HD 2,67 млн проб в лаборатории молекулярной патологии «Геномед» (Москва). У всех трёх пациенток исследовался характер инактивации X-хромосомы.

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики ТНИМЦ. Информированное согласие от родителей пробандов получено. Исследование выполнено с применением научного оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Для определения характера инактивации X-хромосомы использовали метил-чувствительную ПЦР на область первого экзона X-сцепленного гена *AR*. ДНК выделяли путём стандартной фенол-хлороформной экстракции. ДНК обрабатывали метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции *HpaII*. Амплификацию участка гена *AR* проводили методом ПЦР с использованием последовательностей FAM-меченных олигонуклеотидных праймеров [4]. В состав реакционной смеси входили: 2,5 мМ смесь dNTP, буфер для Hot Start Taq ДНК-полимеразы (67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween-20), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 пкМ каждого праймера и 1 е.а. Hot Start Taq ДНК-полимеразы (Сибэнзим, Россия). Последовательности праймеров имели следующий состав: 5'-FAM-TCCAGAATCTGTTCCAGAGC-3' и 5'-GCTGTGAAGTTGCTGTTCC-3'. Фрагментный анализ продуктов ПЦР осуществляли в денатурирующем геле на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) в присутствии стандарта длины молекул ДНК GeneScan500-TAMRA (Applied Biosystems, США). Идентификацию аллелей проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper Software (Applied Biosystems, США).

Степень инактивации X-хромосомы рассчитывали, согласно формуле:  $(Bd1/Bu1)/(Bd1/Bu1 + Bd2/Bu2)$ , где Bd1 — интенсивность пика, продуцируемого *HpaII*-рестрицированным аллелем с максимальной интенсивностью сигнала, Bd2 — интенсивность пика, продуцируемого *HpaII*-рестрицированным аллелем с минимальной интенсивностью сигнала, Bu1 и Bu2 — соответствующие интенсивности пиков, продуцируемых нерестрицированными аллелями (Lau et al., 1997). Степень инактивации < 75 % соответствовала равновероятному характеру инактивации, а ≥75% принималась как асимметричная инактивация в соответствии с критериями, описанными нами ранее [5].



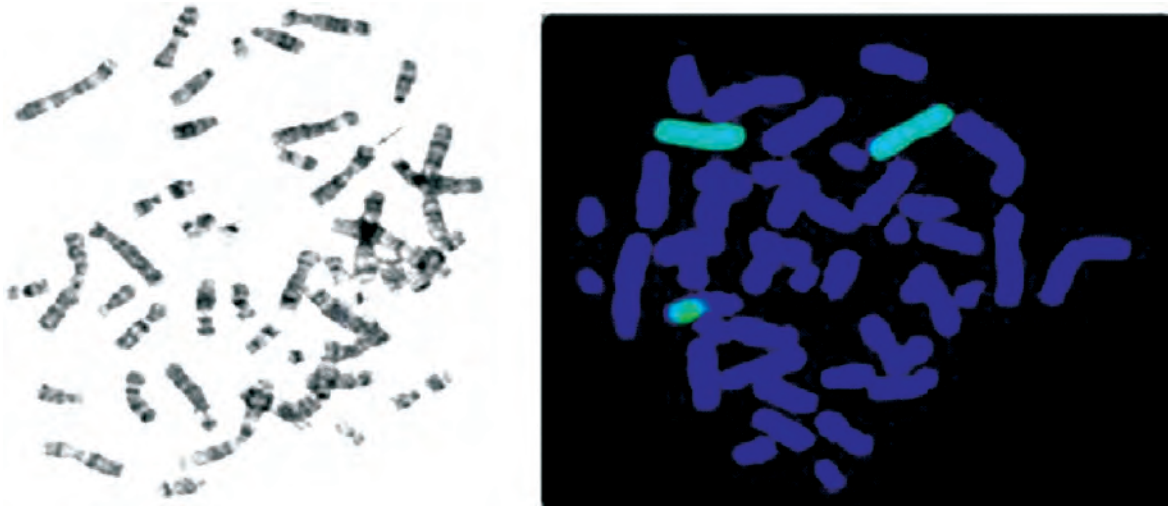


Рис. 1. Результаты цитогенетического и CISH-анализа с цельнохромосомной пробой WCP3 пациентки А.

## Результаты и обсуждение

### Пациентка А.

У пациентки с предполагаемым диагнозом *синдром Шерешевского — Тернера* в возрасте 16 лет проведены стандартный цитогенетический и FISH анализ и выявлена несбалансированная транслокация 46,X,der(X)t(X;3) (рис. 1). Методом aCGH была проведена верификация транслокации и уточнены точки разрыва — 46,X,t(X;3)(p11.3;q21.3) (рис. 2).

У пациентки дуплицирован крупный участок длинного плеча хромосомы 3 и имеется частичная моносомия короткого плеча X-хромосомы. Структурные перестройки X-хромосомы, связанные с потерей одного набора генов на коротком плече, чаще всего связаны с проявлением клинических симптомов синдрома Шерешевского—Тернера [6]. У девушки наблюдались типичные признаки синдрома: гипоплазия матки и яичников, короткая шея с крыловидными складками, низкая граница роста волос на лбу и шее и т.д. (табл. 1). Кроме того, у пациентки присутствовали некоторые клинические черты, характерные для дупликаций dup(3)(q21-qter) и dup(3)(q23-qter), такие, как гирсутизм, синофриз, пороки опорно-двигательного аппарата (табл. 1), но не наблюдалось умственной отсталости, характерной для дупликаций этих хромосомных регионов.

Мы провели анализ характера инактивации X-хромосомы в лейкоцитах периферической крови пациентки и обнаружили 100% асимметричную инактивацию, что указывает на то, что активной остается именно нормальная X-хромосома, так как клон клеток, содержащий активный дериват, скорее всего, не жизнеспособен. Так как фенотип пациентки сильно отличается от клинической картины дупликации dup(3)(q21q-qter) логично предположить, что большая часть генов, локализован-

ных в дуплицированном участке хромосомы 3, инактивирована. Для того, чтобы выяснить, какие именно гены инактивируются на сверхчисленном участке, необходимы дальнейшие исследования.

### Пациентка Б.

В возрасте 9 месяцев девочка с задержкой психомоторного развития была направлена на цитогенетическое исследование. После проведения стандартного цитогенетического анализа у пациентки была обнаружена реципрокная транслокация 46X,t(X;9)(q22;q13) (рис. 3). Последующий анализ методом aCGH показал, что транслокация у пациентки является сбалансированной, а в регионе 22q11.22 имеется микроделеция размером 65 т.п.н., затрагивающая два гена — *PRODH* и *DGCR5*

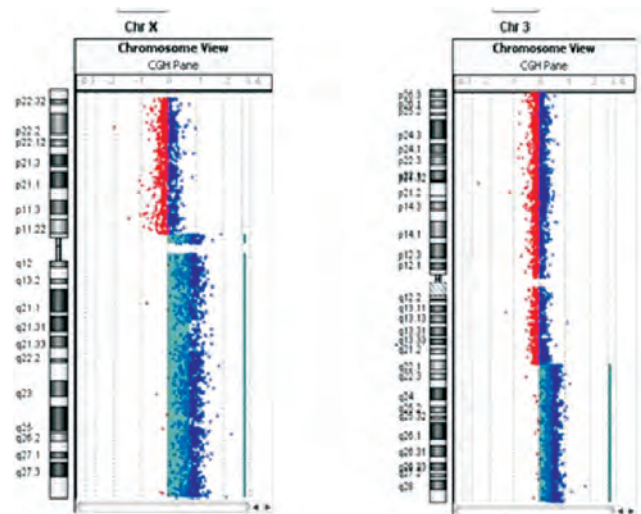


Рис. 2. Результаты aCGH у пациентки с кариотипом 46,derX,t(X;3)(p11.3;q21.3).

Фенотипические черты пациентов с хромосомными перестройками, затрагивающими длинное плечо хромосомы 3

46,X,der(X)t(X;3)(p11.3;q22.1) (настоящее исследование)	dup(3)(q21-qter) [7] dup(3)(q23-qter) [8]
Интеллект сохранен, демонстрирует лидерские качества	Задержка умственного развития
Короткая шея с крыловидными складками*	Шейный птеригиум*
Синофриз*	Густые сходящиеся брови*
Гирсутизм*	Гирсутизм*
Легкий эпикант, более выраженный справа*	Монголоидный разрез глазных щелей*
Гипоплазия крыльев носа	Короткий вздернутый нос
Ушные раковины ротированы назад, правое ухо уплощено*	Низко расположенные деформированные ушные раковины с отсутствием мочек*
Гипоплазия 5 пальцев кистей, камптодактилия 3–5 пальцев кистей *	Пороки опорно-двигательного аппарата*
Воронкообразная деформация грудины	—
Гипоплазия матки и яичников	—
Макростомия	—
Шитовидная грудная клетка	
Гиперметропический астигматизм*	Пороки глаз*
—	Высокое небо
Сандалевидная щель	—
—	Микроретрогнатия
—	Пренатальная гипоплазия
Низкая граница волос на лбу и шее	Брахицефалия
—	Узкий скошенный лоб
—	Выступающая верхняя челюсть

Примечание. \* — общие клинические черты.

(рис. 4). Эта микроделеция относится к синдрому проксимальной микроделеции 22q11.2 (синдром Ди Джорджи, OMIM 611867). У пациентки наблюдаются врожденные аномалии развития головного мозга и мочеполовой системы (табл. 2). В возрасте 4 месяцев появились судороги.

Результаты анализа характера инактивации продемонстрировали 100% смещение в сторону инактивации материнской X-хромосомы. В результате транслокации *de novo* у пациентки произошел реципрокный обмен между хромосомами X и 9. Центр инактивации X-хромосомы, содержащий ген *XIST* и локализованный в сег-

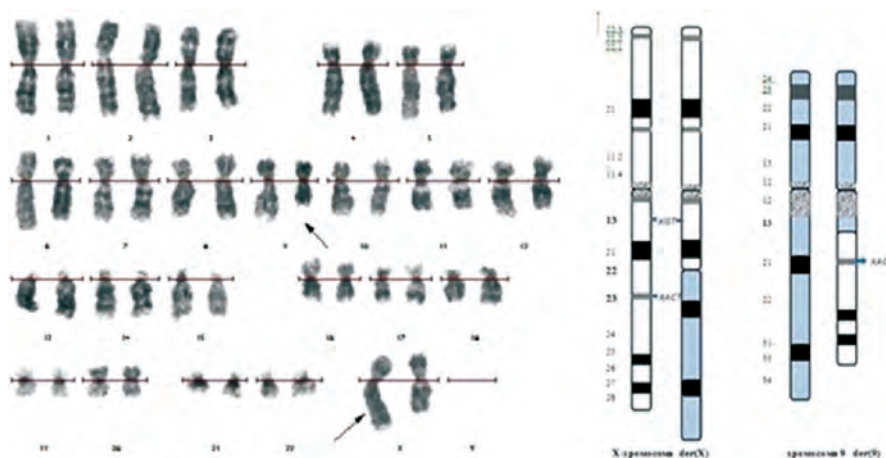


Рис. 3. Результаты цитогенетического анализа лейкоцитов периферической крови пациентки Б. А — G-окраска, Б — схематичное изображение реципрокной транслокации.

менте q13, остался в данном случае на X-хромосоме, а ген *XACT* (X-active coating transcript), локализованный в сегменте q23, переместился на хромосому 9 (рис. 3). Ген *XACT* кодирует еще одну lncRNA, задействованную в процессе инактивации X-хромосомы [9]. Его транскрипт, вероятнее всего, контролирует распространение XIST-РНК по активной X-хромосоме в течение преимплантационного развития эмбриона [9]. Предполагают, что таким образом предотвращается преждевременная инактивация X-хромосомы у человека в раннем эмбриогенезе. Так как XACT-РНК, подобно транскрипту гена *XIST*, работает только в *cis*-положении, то перемещение гена на другую хромосому может привести к тому, что перестроенная X-хромосома будет инактивироваться еще до имплантации во всех клетках бластоцисты. Соответственно, клетки, в которых произошла инактивация нормальной X-хромосомы, становятся нежизнеспособными.

Мы установили, что у пациентки в лимфоцитах периферической крови инактивирована одна и та же X-хромосома, но на основании имеющихся данных не можем сделать заключение какая именно — дериват или нормальная X. Чаще всего в подобных случаях инактивированной оказывается нормальная X-хромосома. Тогда причиной клинических проявлений могут быть повреждения генов, локализованных в точках разрыва. Так, совсем недавно был описан случай, когда у пациентки со сбалансированной транслокацией 46,X,der(X;9)(q23;q12) точка разрыва располагалась в X-хромосоме между генами *AMMECR1* и *RGAG1*. Анализ экспрессии в лимфобластоидных клеточных линиях и в лейкоцитах показал отсутствие транскриптов гена *AMMECR1*. У девятилетней пациентки наблюдались диспропорционально низкий рост, дефект межжелудочковой перегородки, сколиоз, дисплазия кости, потеря слуха, но не было отставания умственного развития [10].

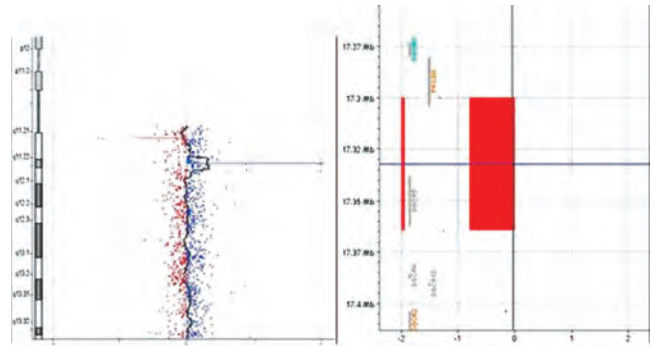


Рис. 4. Делеция в регионе 22q11.22 у пациентки Б.

И в нашем случае логично предположить, что инактивируется нормальная X-хромосома, но клинические симптомы у описываемой нами пациентки сходны с некоторыми симптомами больных с делециями длинного плеча del(9)(q22-q32), а именно задержка умственного развития с эпилептическими припадками, а также с гидронефроз (табл. 2). Однако у пациентки отсутствовали множественные лицевые дисморфии, характерные для больных с делецией [8]. Кроме того, клинические симптомы пациентки частично сходны с таковыми у девочки задержкой умственного развития и лицевыми дисморфиями со сбалансированной транслокацией 46,X,t(X;9)(q28;q12) (табл. 2). У пациентки в возрасте 2,5 года начались судороги, в 6 лет наблюдалась задержка психомоторного развития [11]. Но в том случае у больной была выявлена равновероятная инактивация X-хромосомы и в лимфоцитах, и в фибробластах, поэтому нельзя исключить проявления частичной функциональной моносомии по длинному плечу хромосомы 9. Наконец, еще в одной ранней работе описывалась пациентка со сбалансированной транслокацией 46,X,der(X;9)(q23;q12), у которой нормальная X-хромо-

Таблица 2

**Клинические характеристики пациентов с различными перестройками, затрагивающими хромосому 9**

46,X,t(X;9)(q22;q13) (настоящее исследование)	46,X,t(X;9)(q28;q12) (Wolff et al., 1998)	del(9)(q22-q32) (Schinzel, 2001)
Задержка умственного развития*	Задержка умственного* развития	Задержка умственного* развития
Задержка психомоторного развития	Задержка психомоторного* развития	—
Эпилепсия симптоматическая фокальная*	—	Эпилепсия*
Пиелоктазия двухсторонняя*	—	Гидронефроз*
Гипогенезия мозолистого тела	—	—
Миотонический синдром*	Гипотония тела и конечностей*	—
—	Оральная моторная дисфункция с затрудненным дыханием	—
—	Нарушены глубокие сухожильные рефлексы	—
Лентовидная гетеротропия	—	—
Пахигирия	—	—
—	—	Лицевые дисморфии

сома характеризовалась поздней репликацией, то есть, была инактивированной в 100% клеток. Но из фенотипических аномалий у нее наблюдалась только дисгенезия гонад [1]. В случае сбалансированных транслокаций X;аутосома чаще всего инактивированной является нормальная X-хромосома, но в отдельных случаях обнаруживается преимущественная инактивация деривата. Так, у девочки со сбалансированной транслокацией 46,X,t(X,9)(q28;q21), умственной отсталостью, двухсторонним расширением грудинно-ключично-сосцевидной мышцы, ожирением и другими минорными аномалиями была обнаружена инактивация деривата, но при этом аутосомная часть перестроенной хромосомы не инактивировалась [12]. Авторы предположили, что клиническая картина у пациентки появляется из-за функциональной дисомии региона Xq28, который находился на хромосоме 9 и, соответственно, не инактивировался. Поэтому без дополнительных исследований статуса метилирования нормальной X-хромосомы и деривата невозможно исключить, что у пациентки Б. инактивирована именно перестроенная X-хромосома.

С другой стороны, у пациентки Б. была идентифицирована микроделеция в регионе 22q11.2. Синдром микроделеции 22q11.2 характеризуется фенотипической вариабельностью: от незначительного нарушения обучаемости и слабо выраженных лицевых дизморфий до тяжелой умственной отсталости и множественных врожденных пороков развития, в том числе аномалий развития мозга (редукция серого и белого вещества, аномалии мозолистого тела, миндалина и т.д.) [13]. Чаще всего

размер делеции составляет около 3 млн п.н., реже 1,5 млн п.н. Микроделеция 22q11.22 у пациентки Б. составляет 65 т.п.н. и затрагивает только два гена — *PRODH* и *DGCR5*. Продуктом гена *DGCR5* является длинная некодирующая РНК, вовлеченная в регуляцию процессов клеточной пролиферации, миграции и инвазии. Ген *PRODH* кодирует митохондриальный белок, который катализирует первый этап деградации пролина. Недостаток продукта приводит к избытку пролина, который приводит к нарушению функций мозга (OMIM 606810). Поэтому микроделеция в регионе 22q11.22 у нашей пациентки может являться причиной нарушений развития мозга.

#### Пациентка В.

Третья пациентка имела с реципрокную транслокацию 46,X,t(X;10)(p22.2;q11.2).

В возрасте 1 месяца у ребенка наблюдалась мышечная гипотония. Развивалась с задержкой психомоторного развития, голову держала с 3 месяцев, сидела и ползала с 8,5 месяцев, вставала с 1 года, пошла в 1 год 5 месяцев. В 1 год 11 месяцев осмотр невролога: выявляются стигмы дизэмбриогенеза. Мышечный тонус равномерно снижен. Сухожильные рефлексы снижены, d = 4. Ходит самостоятельно, походка атактичная. Малоэмоциональная. Речи нет, обращенную речь не вполне понимает. Результаты ЭЭГ: выявляются признаки незрелости коркового ритма, активации и умеренной дисфункции срединно-стволовых структур мозга. Диагноз: *органическое поражение ЦНС, атактический синдром, задержка психоречевого развития ребенка с хромосомной патологией.*

После анализа ДНК пациентки на микрочипах Affymetrix CytoScan HD не выявлено патогенного хромосомного дисбаланса. Анализ инактивации X-хромосомы выявил равновероятную X-инактивацию (60%).

В результате транслокации у пациентки произошел обмен части короткого плеча X-хромосомы и длинного плеча хромосомы 10 (рис. 5). Длинное плечо аутосомы в участке Xq22.2 присоединилось к X-хромосоме. Так как этот участок X-хромосомы избегает инактивации, то материал аутосомы тоже не мог быть инактивирован, а равновероятной инактивации подверглись обычные участки обеих X-хромосом, которые не были затронуты хромосомной перестройкой.

В этом случае инактивация X-хромосомы, скорее всего, никоим образом не влияет на проявление фенотипа. Тогда остается неясной причина проявления серьезных клинических симптомов у девочки. Вероятно, в данном случае точки разрыва затрагивают гены, нарушения функций которых могут привести к проявлению данных симптомов. Регион 10q11.2 занимает 11,3 млн п.н., и в нем локализовано более 150 генов. Поэтому, чтобы найти кандидатные гены, нарушения экспрессии которых вызывают дизморфии у этой пациентки, необходимо более точно локализовать точки разрыва на аутосоме и X-хромосоме путём сиквенса этого региона.

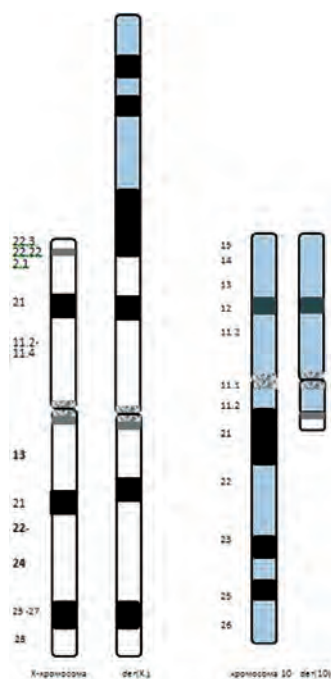


Рис. 5. Схематическое изображение транслокации 46,X,t(X;10)(p22.2;q11.2).

В литературе встречается описание одного случая похожей транслокации 46,X,der(X;10)(p22.3;q11). Характер инактивации X-хромосомы также был равновероятным и лимфоцитах и в фибробластах, но у носительницы транслокации наблюдалась только умственная отсталость и не имелось дизморфий [1].

Кроме того, не стоит исключать функциональную дисомию региона Xq28 в половине клеток у пациентки В., которая тоже может вносить свой вклад в клиническую картину.

Таким образом, в случае несбалансированной транслокации X;аутосома (пациентка А) инактивация X-хромосомы значительно смягчает клиническую картину хромосомной перестройки, тогда как сбалансированная транслокация (пациентки Б и В) проявляется тяжелыми клиническими симптомами, которые могут быть вызваны несколькими причинами: локализацией точек разрыва на обеих хромосомах, дополнительными хромосомными перестройками (пациентка Б) и эпигенетическим статусом дериватов, так как в случае преимущественной инактивации деривата X, с одной стороны, возникает функциональная моносомия аутосомной части, а с другой стороны, функциональная дисомия части длинного плеча X-хромосомы, перенесенного на аутосому. И то, и другое могут вызвать тяжелые клинические последствия.

#### Список литературы

- Schmidt M., Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases // *Am J Med Genet.* 1992. V. 42. № 2. P. 161-169.
- Giorda R., Bonaglia M.C., Milani G. et al., Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in a girl with microcephaly, mild dysmorphic features and t(X;5)(q22.1;q31.1) // *Eur J Hum Genet.* 2008. V. 16. № 8. P. 897-905.
- White W.M., Willard H.F., Van Dyke D.L. et al. The spreading of X inactivation into autosomal material of an X;autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA // *Am J Hum Genet.* 1998. V. 63. № 1. P. 20-28.
- Mutter G.L., Boynton K.A. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies // *Nucl Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1411-1418.
- 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. 43. № 3. С. 401-405.
- Razavi Z., Momtaz H.E. Balanced reciprocal translocation t(X;1) in a girl with tall stature and primary amenorrhea // *Iran J Med Sci.* 2017. V. 42. № 2. P. 210-214.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. Москва: Медпрактика-М. 2006. 318 с.
- Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Berlin-New York: Walter de Cauter. 2001. 966 p.
- Vallot C., Patrat C., Collier A.J. XACT noncoding RNA competes with XIST in the control of X chromosome activity during human early development // *Cell Stem Cell.* 2017. V. 20. P. 102-111.
- Moyses-Oliveira M., Fish R., Giannuzzi G et al. Balanced X autosome translocation suggests association of AMMECR1 disruption with hearing loss short stature bone and heart alterations // *Molecular Cytogenetics.* 2017. V. 10 (Suppl 1):20 DOI 10.1186/s13039-017-0319-3.
- Wolff D.J., Schwartz S., Montgomery T., et al., Random X inactivation in a girl with a balanced t(X;9) and an abnormal phenotype // *Am J Med Genet.* 1998. V. 77. № 5. P. 401-404.
- Du Sart D., Kalitsis P., Schmidt M. Noninactivation of a portion of Xq28 in a balanced X-autosome translocation // *Am J Med Genet.* 1992. V. 42. № 2. P. 156-160.
- Кашеварова А.А., Лебедев И.Н., Назаренко Л.П. Архитектура генома и хромосомные болезни, синдромы реципрокных микроделетий и микродупликаций / Атлас под ред. академика РАН В.П. Пузырёва, Томск: «Печатная мануфактура». 2014. 54 с.

# Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости бластоцисты человека

Жигалина Д.И.<sup>1\*</sup>, Скрябин Н.А.<sup>2</sup>, Канбекова О.Р.<sup>3</sup>,  
Артюхова В.Г.<sup>4</sup>, Светлаков А.В.<sup>4</sup>, Лебедев И.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050; \*darya.zhigalina@medgenetics.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050

<sup>3</sup> ОГАУЗ «Томский областной перинатальный центр», Томск, 634040

<sup>4</sup> ООО «Красноярский центр репродуктивной медицины», Красноярск, 660037

Сравнение молекулярных кариотипов внеклеточной ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты, клеток эмбриобласта и трофэктодермы открывает новые перспективы для изучения цитогенетических механизмов формирования числовых хромосомных нарушений в преимплантационном периоде развития человека. Кроме того, такой анализ позволяет оценить диагностическую ценность внеклеточной ДНК как дополнительного источника информации об эмбриональном кариотипе при преимплантационной генетической диагностике. Цель исследования — сравнительное молекулярно-цитогенетическое кариотипирование эмбриобласта, трофэктодермы и внеклеточной ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты. Методами метафазной и микроматричной геномной гибридизации проанализировано 29 бластоцист человека 5 дня развития. Внеклеточная ДНК была успешно амплифицирована в 86,2% (25/29) образцов. По результатам анализа трофэктодермы, эмбриобласта и внеклеточной ДНК, бластоцисты были эуплоидными в 31%, 36% и 28% случаев соответственно. Лишь 3 бластоцисты из 29 (10,3%) имели нормальный кариотип по данным анализа всех трех образцов. Всего было выявлено 175 анеуплоидий, при этом трисомии, моносомии, частичные три- и моносомии встречались с частотой 47,4%, 46,9%, 5,1% и 0,5% соответственно. Отмечено преобладание трисомий в эмбриобласте, недоступном для преимплантационного генетического скрининга. Хромосомный мозаицизм выявлен в 14 обследованных бластоцистах (48,2%), а в 44,8% бластоцист описаны реципрокные анеуплоидии, представленные сочетанием трисомии и моносомии по одной паре гомологичных хромосом. Всего зафиксировано 25 реципрокных анеуплоидий, в формирование которых было вовлечено 50 из 175 анеуплоидий (28,5%). Таким образом, внеклеточная ДНК может быть успешно амплифицирована и проанализирована современными молекулярно-цитогенетическими методами. Результаты сравнительного молекулярного кариотипирования внеклеточной ДНК, клеток эмбриобласта и трофэктодермы в целом свидетельствуют о недооценке частоты анеуплоидных и мозаичных бластоцист. Установлено, что в 72,4% случаев молекулярные кариотипы эмбриобласта и трофэктодермы не являются идентичными, что говорит о невозможности прямой экстраполяции результатов преимплантационного генетического скрининга биопсированных клеток трофэктодермы на внутреннюю клеточную массу. Соответственно, внеклеточная ДНК в полости бластоцист человека может рассматриваться как важный дополнительный источник информации о кариотипе эмбриона при проведении преимплантационной генетической диагностики.

**Ключевые слова:** внеклеточная ДНК, внутриполостная жидкость бластоцисты, эмбриобласт, трофэктодерма, хромосомный мозаицизм, реципрокные анеуплоидии.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08265.

## Comparative cytogenetics of embryoblast, trophoctoderm and blastocoele fluid of human blastocyst

Zhigalina D.I.<sup>1\*</sup>, Skryabin N.A.<sup>2</sup>, Kanbekova O.R.<sup>3</sup>,  
Artyukhova V.G.<sup>4</sup>, Svetlakov A.V.<sup>4</sup>, Lebedev I.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050; \*darya.zhigalina@medgenetics.ru

<sup>2</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050

<sup>3</sup> Tomsk Regional Perinatal Center, Tomsk, 634040

<sup>4</sup> Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk, 660037

**Relevance.** A comparison of the molecular karyotypes of the cell-free DNA from the blastocoele fluid of the blastocyst, the embryoblast and trophoctoderm cells provides new possibilities for studying of the cytogenetic mechanisms of the formation of numerical chromosomal abnormalities at the preimplantation stage of human development. In addition, such analysis allows us to evaluate the diagnostic yield of cell-free DNA as an additional source of information about the embryo karyotype for preimplantation genetic diagnosis. **Aim.** Comparative molecular cytogenetic karyotyping of embryoblast, trophoctoderm and the cell-free DNA from the blastocoele fluid of the blastocyst. **Materials and methods.** Twenty-nine human blastocysts of the 5th day of development were analyzed by metaphase and array comparative genomic hybridization. **Results.** Cell-free DNA was successfully amplified in 86.2%

(25/29) of the samples. Blastocysts were euploid in 31%, 36% and 28% of cases according to the results of analysis of trophectoderm, embryoblast and cell-free DNA, respectively. Only 3 out of 29 (10.3%) blastocysts had a normal karyotype according to the analysis of all three samples. A total of 175 aneuploidies were detected. Trisomies, monosomies, partial tri- and monosomies were observed at a frequency of 47.4%, 46.9%, 5.1%, and 0.5%, respectively. The prevalence of trisomy was noticed in the embryoblast, which is not available for preimplantation genetic screening. Chromosomal mosaicism was detected in 14 examined blastocysts (48.2%). The reciprocal aneuploidies presented by combination of trisomy and monosomy with one pair of homologous chromosomes were described in 44.8% of blastocysts. A total of 25 reciprocal aneuploidies were observed with involvement of 50 from 175 (28.5%) detected aneuploidies. **Conclusions.** The cell-free DNA can be successfully amplified and analyzed by current molecular cytogenetic techniques. The results of comparative molecular karyotyping of cell-free DNA, embryoblast and trophectoderm cells indicate an underestimation of the frequency of aneuploid and mosaic blastocysts. It was found that in 72.4% of cases the molecular karyotypes of the embryoblast and trophectoderm are not identical. This finding provides evidence for impossibility of a direct extrapolation of the results of preimplantation genetic screening of trophectoderm cells to the inner cell mass. Accordingly, the cell-free DNA from the blastocoele fluid can be considered as an important additional source of information about the embryo karyotype in preimplantation genetic diagnosis.

**Keywords:** cell-free DNA, blastocoele fluid, embryoblast, trophectoderm, chromosomal mosaicism, reciprocal aneuploidy.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant № 15-04-08265.

### Введение

В последние два десятилетия в связи с активным развитием экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и методов преимплантационной генетической диагностики и скрининга (ПГД/ПГС) появилась уникальная возможность изучить процессы развития человека на самых ранних этапах [1]. Были получены новые генетические данные, которые позволили существенно повысить эффективность ПГД/ПГС. В настоящий момент известно, что молекулярно-цитогенетический анализ I и II полярных тел, позволяет оценить хромосомный статус ооцита [2]. С использованием данного подхода было показано, что около 95% хромосомных aberrаций, обнаруживаемых у эмбрионов на преимплантационном этапе развития, имеют материнское происхождение. В рамках ПГС анализ полярных тел дает возможность успешно отсеивать ооциты с анеуплоидиями [3]. Кроме того, использование микроматричного анализа I и II полярных тел позволило продемонстрировать механизм нормализации кариотипа ооцита в ходе мейотических делений [4]. Ограничением такого анализа является невозможность получить информацию о кариотипе клеток эмбриона и оценить наличие хромосомного мозаицизма.

До недавнего времени примерно 90% всех зарегистрированных циклов ПГД в мире составляла биопсия одного/двух бластомеров на стадии дробления [5]. Однако использование ряда молекулярно-цитогенетических методов показало, что кариотипы бластомеров одного эмбриона часто не идентичны. В связи с этим был поставлен вопрос о распространении на ранних этапах развития хромосомного мозаицизма [6]. Стало очевидно, что ошибки митоза в ходе дробления эмбриона вносят существенный вклад в формирование числовых хромосомных нарушений, а микросателлитный анализ позволил реконструировать хромосомный статус бластомеров на каждом митотическом делении и продемонстрировать механизмы формирования мозаичных кариотипов [7].

В настоящее время в центрах репродуктивной медицины набирает популярность биопсия клеток трофэкто-

дермы (ТЭ) на стадии бластоцисты, которая позволяет снизить вероятность получения ложноположительного результата вследствие хромосомного мозаицизма [8]. В свою очередь, анализ эмбриобласта (ЭБ) и ТЭ позволил бы оценить распределение между тканями анеуплоидных клеток. В некоторых исследованиях указывается на то, что результаты, полученные на основании биопсии клеток ТЭ можно, как правило, экстраполировать на клетки ЭБ [9, 10], хотя до сих пор однозначно не установлена связь мозаицизма в ЭБ и ТЭ [11]. Использование мышинных эмбрионов в качестве модельного объекта позволило выявить различия в частоте элиминации аномальных клеток из ЭБ и ТЭ. Более того, путём создания химер было продемонстрировано рождение жизнеспособных особей из мозаичных эмбрионов [12]. Аналогичные результаты были получены и для человека после переноса эмбрионов с мозаичным кариотипом [13]. Вопрос относительно коррекции эмбрионального кариотипа также широко обсуждается в настоящее время [14].

В 2013 году было продемонстрировано присутствие внеклеточной ДНК (внДНК) во внутрисполостной жидкости бластоцисты [15], после чего несколькими исследовательскими группами были инициированы работы, в которых проводилось сравнение молекулярных кариотипов внДНК с полярными телами, бластомерами, клетками ТЭ, либо с целой бластоцистой [4, 16]. Однако полученные результаты оказались противоречивыми. В связи с этим возможность использования внутрисполостной жидкости в качестве материала для проведения ПГС до сих пор остается дискуссионной. Достоверно неизвестно, является ли молекулярный кариотип внДНК из полости бластоцисты интегральным кариотипом погибших клеток, либо отражает в большей степени кариотипы клеток только одной из тканей — ТЭ или ЭБ [17]. Поскольку ранее не было получено таких данных, целью настоящей работы стало проведение сравнительного молекулярно-цитогенетического кариотипирования ЭБ, ТЭ и ДНК из внутрисполостной жидкости бластоцисты.

### Материалы и методы

В настоящей работе проанализировано 29 бластоцист человека пятого дня развития, которые были получены после подписания информированного согласия от пациентов Томского областного перинатального центра и Красноярского центра репродуктивной медицины. Бластоцисты культивировались на средах G-1 PLUS, G-2 PLUS (Vitrolife). Из каждой бластоцисты проводилась аспирация внутриполостной жидкости по методике, описанной в литературе [4]. Забранная жидкость переносилась в стерильную микропробирку, содержащую 2,5 мкл раствора PBS (Qiagen, США), и замораживалась при 20С. Затем проводилось разделение ЭБ и ТЭ. В 15 бластоцистах оно осуществлялось с использованием лазерной микрохирургической системы OCTAX Laser Shot (MTG, Германия), в остальных 14 эмбрионов — микроманипулятором Narishige (Япония). После разделения клетки помещались в стерильные пробирки с раствором PBS и замораживались. Были проведены лизис клеток всех образцов и полногеномная амплификация. ДНК из клеток ЭБ, ТЭ и из полости 15 бластоцист была амплифицирована набором Rubicon PicoPlex (Rubicon Genomics, США), 14 бластоцист — набором REPLI-g MiniKit (#150023, Qiagen, США). В качестве контрольного образца использовали ДНК индивида мужского пола с нормальным кариотипом (#5190-4240, Agilent Technologies, США) для проведения сравнительной геномной гибридизации (Comparative Genomic Hybridization, CGH).

14 бластоцист были проанализированы методом CGH на метафазных пластинках. ДНК после полногеномной амплификации в ходе реакции ник-трансляции метили флуоресцентными красителями (Fluorescein, TAMRA). Препараты метафазных хромосом получали из лимфоцитов периферической крови индивида мужского пола с нормальным кариотипом. Гибридизация ДНК-библиотек на метафазные пластинки проводилась в гибридизационной камере «ThermoBrite» (Abbott Molecular, США) в течение 72 часов при 37°С с 50х избытком C<sub>0</sub>t-1 ДНК (#5190-3393, Agilent Technologies, США). Препараты метафазных хромосом окрашивали DAPI. Детекция гибридизационных сигналов проводилась на люминесцентном микроскопе «AxioImager.Z2» (Carl Zeiss, Германия). Для анализа результатов CGH использовали программный продукт «Isis-CGH Software» (Metasystems, Германия).

Анализ внДНК, ЭБ и ТЭ 15 эмбрионов был проведен методом aCGH (arrayCGH). Для этой цели были использованы микрочипы SurePrint G3 Human CGH Microarrays (8x60K, Agilent Technologies, США). Амплифицированная ДНК была помечена флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5. Гибридизация проводилась в течение 14 часов при 67°С, после чего чипы были отмывы от гибридизационной смеси и отсканированы на приборе SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, США). Графический анализ результатов проводился с использованием программного обеспечения Agilent CytoGenomics Software (v3).

### Результаты

В настоящем исследовании было проведено сопоставление молекулярных кариотипов внДНК из полости бластоцисты, клеток ЭБ и ТЭ 29 бластоцист (табл. 1). ДНК из внутриполостной жидкости была успешно амплифицирована в 86,2% (25/29) образцов. Случаи отсутствия или недостаточного для анализа количества ДНК после полногеномной амплификации были описаны ранее в других работах [4, 15, 16]. В этих исследованиях внДНК была успешно амплифицирована в 89,7% (26/29), 76,5% (39/51) и 63% (60/96) случаев соответственно. Таким образом, эффективность полногеномной амплификации внДНК из полости бластоцист человека в целом сопоставима с опубликованными данными.

По результатам анализа ТЭ в 31% (9/29) случаев бластоцисты оказались эуплоидными. Молекулярное кариотипирование ЭБ и внДНК не выявило анеуплоидий у 36% (10/28) и 28% (7/25) бластоцист соответственно. В 7 бластоцистах в ЭБ и ТЭ отсутствовали хромосомные aberrации и лишь 3 бластоцисты из 29 (10,3%) имели нормальный кариотип по результатам сравнительного анализа всех трех образцов. Полное совпадение кариотипов было зафиксировано только для эуплоидных бластоцист. При наличии во внутриполостной жидкости и тканях бластоцисты хромосомных aberrаций нами было отмечено лишь частичное совпадение кариотипов, либо их полное несоответствие. Таким образом, за исключением эуплоидных образцов и образцов, для которых не было получено продукта ПГА, при сравнении кариотипов внДНК и ЭБ частичное совпадение было выявлено в 3 случаях (3/21), для пары «внДНК — ТЭ» — в 6 случаях (6/22), а для пары «ЭБ — ТЭ» — в 8 случаях (8/22). Наибольшее совпадение хромосом, вовлеченных в анеуплоидию, было выявлено при сравнении молекулярных кариотипов ЭБ и ТЭ (21 совпадение). Сравнение кариотипов в парах «внДНК — ЭБ» и «внДНК — ТЭ» продемонстрировало совпадение по 19 и 16 хромосомам соответственно.

Всего было выявлено 175 анеуплоидий. Трисомии, моносомии, частичные три- и моносомии встречались с частотой 47,4%, 46,9%, 5,1% и 0,5% соответственно. Во внДНК зарегистрировано 67 (34,2%) анеуплоидий, в ЭБ — 68 (34,7%) и в ТЭ — 61 (31,1%). Отмечено преобладание трисомий в ЭБ (40:28), в то время как во внутриполостной жидкости и ТЭ соотношение трисомий и моносомий было близко к единице (32:35 и 31:30 соответственно). Хромосомный мозаицизм был выявлен в 14 бластоцистах (48,2%). Наличие одной и той же анеуплоидии в ЭБ и ТЭ может указывать на ее мейотическое происхождение. Всего в 6 бластоцистах было выявлено 9 таких случаев.

Нами было обнаружено присутствие у эмбрионов на стадии бластоцисты клеточных клонов с трисомией и с моносомией по одной и той же паре гомологичных хромосом — так называемых реципрокных анеуплоидий



(РА). Они были выявлены в 13 из 29 бластоцист (44,8%). Всего было зафиксировано 25 реципрокных числовых хромосомных аномалий. Таким образом, 50 анеуплоидий из 175 (28,5%) были вовлечены в формирование РА. Нами было проанализировано распределение РА между внутрисомной жидкостью и тканями бластоцист, и было выявлено 9 из 12 теоретически возможных комбинаций распределения РА (табл. 2). Сравнительный анализ только ЭБ и ТЭ позволил выявить 36% (9/25) РА. При сравнении вДНК и ЭБ данный показатель соста-

вил 60% (15/25), а при анализе вДНК и ТЭ — 32% (8/25). Таким образом, использование вДНК в качестве источника дополнительной информации о хромосомной конституции эмбриона позволило на 64% повысить вероятность выявления РА по сравнению с анализом только ЭБ и ТЭ. Нами также была оценена частота встречаемости хромосом, которые были вовлечены в формирование РА. Хромосомы 9, 16, 19 наиболее часто были представлены РА — в 12%, 24% и 32% случаев соответственно.

Таблица 1

Молекулярные кариотипы вДНК из внутрисомной жидкости, клеток ЭБ и ТЭ 29 бластоцист

№ бластоцисты	Возраст матери, лет	Стадия развития	Внутрисомная жидкость	Эмбриобласт	Трофобласт
1	30	BI3AA	ish cgh dim(16,19)	ish cgh enh(1,16,19,20,22),dim(4)	ish cgh dim(19,22)
2	30	BI3AA	ish cgh enh(4),dim(16,17,19,22)	ish cgh enh(16,19,22)	ish cgh enh(14,16),dim(X)
3	29	BI3BB	ish cgh dim(16,17,19)	ish cgh enh(16,17,19,22)	ish cgh dim(16,19)
4	31	BI3AA	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(17,19,22),dim(13)	ish cgh enh(17),dim(12)
5	31	BI3BB	ish cgh enh(4,X),dim(7,16)	ish cgh (1-22)x2,(X,Y)x1	ish cgh (1-22)x2,(X,Y)x1
6	30	BI3BB	ish cgh (1-22)x2,(X,Y) x1	ish cgh enh(16),dim(22,X)	ish cgh enh(10,18),dim(11,19)
7	25	BI3BB	ish cgh (1-22)x2,(X,Y) x1	ish cgh enh(1,11,13),dim(4,5,Y)	ish cgh dim(Y)
8	27	BI3BB	ish cgh enh(17,19)	ish cgh enh(3,X),dim(17,19,21)	ish cgh enh(14,17,19,21),dim(1,13)
9	31	BI3BB	ish cgh (1-22)x2,(X,Y)x1	ish cgh enh(16,17,19,21)	ish cgh enh(20,X),dim(15)
10	31	BI4AA	ish cgh dim(16)	ish cgh enh(16),dim(17,19,21)	ish cgh enh(3,11,16),dim(17,19,21)
11	33	BI3AB	ish cgh enh(19,20,21),dim(4,6)	ish cgh dim(19)	ish cgh (1-22)x2,(X)x1
12	37	BI4AA	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh dim(19,20,21)	ish cgh enh(1,4,19)
13	25	BI3BB	ish cgh enh(19,21)	ish cgh enh(4),dim(17,19,21)	ish cgh enh(16,18),dim(8)
14	25	BI3BB	ish cgh enh(19)	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(3,13),dim(19)
15	23	—	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
16	23	—	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
17	32	BI4BB	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
18	—	BI3BB	arr(19)x3	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
19	33	BI3-4AB	arr(3,6,8,17)x3,(2,7,10)x1	arr(1-22)x2,(X,Y)x1	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
20	37	BI4-5AA	arr(2,3q,11,19)x3	arr(1-22,X)x2	arr(X)x1
21	37	BI4-5BB	arr(16,17,19,20)x3, (3,10,12,13,15,22)x1,(9)x0	arr(1-22,X)x2	arr(9)x3,(20)x1
22	33	BI4BB	arr(8,11,19,20,21)x3,(7)x1	arr(7)x1	arr(7)x1
23	32	—	arr(X)x2	arr(1-22)x2,(X,Y)x1	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
24	39	BI3BB	arr(19p)x3,(9)x1	arr(9)x3	arr(9)x3
25	39	BI3-4BB	arr(1)x3,(13)x1	arr(10q)x3,(13)x1	arr(13)x1
26	39	BI2	arr(2,5)x1,(4,16,X)x0	arr(10q,6)x3,(13,20,21)x1,(4)x0	arr(16)x4,(1,2,6)x3, (3,9,17,19,20)x1,(10)x0
27	31	BI3BB	arr(1-22)x2,(XY)x1	arr(5,15,16q,17q,20p)x3,(X)x0	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
28	31	BI2AB	Отсутствие продукта ПГА	arr(9q,13,18,19)x3	arr(1p)x3,(9q)x1,(Xq)x0
29	34	3BI3BB	Отсутствие продукта ПГА	arr(1-22)x2,(X,Y)x1	arr(X)x2,(Y)x0

Примечание. ПГА — полногеномная амплификация.

## Обсуждение

Молекулярно-цитогенетический анализ внДНК из внутриполостной жидкости, а также сравнение реконструированного молекулярного кариотипа с кариотипами

клеток ЭБ и ТЭ позволяют получить уникальную информацию о природе внДНК и возможности ее использования в ПГД. В настоящей работе было продемонстрировано, что внДНК может быть успешно амплифици-

Таблица 2

Варианты распределения клеток с реципрокными анеуплоидиями между внутриполостной жидкостью, ЭБ и ТЭ

Вариант распределения	Внутриполостная жидкость	Внутренняя клеточная масса	Трофэктодерма
1	Трисомия	Моносомия	Трисомия
	17	17	17
	19	19	19
2	Моносомия	Трисомия	Моносомия
	16	16	16
	19	19	19
3	Трисомия	Моносомия	Моносомия
4	Моносомия	Трисомия	Трисомия
	9	9	9
	16	16	16
5	Трисомия	Трисомия	Моносомия
6	Моносомия	Моносомия	Трисомия
7	Моносомия	Трисомия	N
	16	16	
	17	17	
	19	19	
8	Трисомия	Моносомия	N
	19	19	
	21	21	
9	Трисомия	N	Моносомия
	19		19
	20		20
10	Моносомия	N	Трисомия
	2		2
	9		9
	16		16
11	N	Трисомия	Моносомия
		9q	9q
		22	22
12	N	Моносомия	Трисомия
		19	19
		21	21

Примечание. N — сбалансированный хромосомный набор по результатам CGH/aCGH. В таблице обозначены хромосомы, вовлеченные в реципрокные анеуплоидии.

рована наборами для ПГА как на основе ПЦР, так и MDA (Multiple Displacement Amplification). Амплифицированная ДНК пригодна для дальнейшего анализа методами метафазной CGH и aCGH. Несмотря на то, что для исследования были взяты бластоцисты, по качеству пригодные для переноса в ходе циклов ЭКО, 76% эмбрионов оказались мозаичными или анеуплоидными. Анализ внутриполостной жидкости показал наличие дополнительных хромосомных аномалий относительно ЭБ и ТЭ, что позволяет предположить более высокий уровень мозаицизма у эмбрионов на 3–4-й день после оплодотворения. Более того, обнаружение дополнительных анеуплоидий во вндНК может указывать на наличие небольшого процента (менее 30%) аномальных клеток, не выявленных в ходе анализа тканей в связи с ограничениями методов CGH и aCGH. Сообщается, что частота хромосомного мозаицизма на стадии бластоцисты превышает 90%, что может приводить к ошибкам в ходе ПГС [11, 18]. Наличие анеуплоидий во внутриполостной жидкости бластоцисты, ТЭ которой оказалась эуплоидной по результатам диагностики, вероятно, свидетельствует о присутствии в эмбриональных тканях анеуплоидного клеточного клона. При этом сравнительно недавно было продемонстрировано, что эффективность детекции хромосомного мозаицизма возрастает с увеличением числа взятых для анализа клеток [19]. В таком случае, вндНК может быть использована в качестве дополнительного источника информации о кариотипе эмбриона.

Вероятно, в некоторых случаях перенос мозаичных бластоцист может приводить к рождению детей с нормальным кариотипом [13], в связи с чем возникает вопрос относительно коррекции кариотипа в ходе развития эмбриона [14]. Селективный отбор анеуплоидных клеток присутствует уже на преимплантационной стадии, что заметно на фоне уменьшения числа клеток с числовыми хромосомными aberrациями со стадии дробления до стадии бластоцисты [20]. Благодаря анализу вндНК можно привести два аргумента в пользу коррекции эмбрионального кариотипа. Во-первых, обнаружение анеуплоидий в жидкости бластоцисты и их отсутствие в ЭБ и ТЭ говорит об элиминации аномальных клеток из тканей, в результате чего ДНК из этих клеток попадает во внутриполостную жидкость. Во-вторых, проведенное в нашем исследовании разделение ЭБ и ТЭ позволило сравнить частоты трисомий и моносомий не только между клетками бластоцисты и ее жидкостью, но и между отдельными тканями. Преобладание трисомий в ЭБ (40:28) может косвенно свидетельствовать о том, что клетки ЭБ подвергаются апоптозу чаще, чем клетки ТЭ. При этом во внутриполостной жидкости соотношение трисомий и моносомий было близко к единице. Возможно, такой механизм позволяет исключать из ЭБ моносомные клетки, тем самым способствуя нормальному развитию ткани, дающей в дальнейшем начало всем эмбриональным структурам. В пользу этой гипотезы сви-

детельствует и то, что наиболее часто подвергаются апоптозу анеуплоидные клетки ЭБ по сравнению с клетками ТЭ. Было продемонстрировано, что аномальный клеточный клон в ЭБ элиминируется чаще (41,1%), чем нормальный (19,5%) [12]. В ряде исследований говорится об отсутствии признаков неслучайного и преимущественного распределения анеуплоидных клеток в ТЭ и указывается на то, что результаты, полученные на основании биопсии клеток ТЭ можно, как правило, экстраполировать на клетки ЭБ [9, 10]. Однако в настоящей работе было продемонстрировано лишь частичное совпадение молекулярных кариотипов ЭБ и ТЭ, причем в значительной степени «общие» анеуплоидии, вероятно, имеют мейотическое происхождение. Тем не менее, по спектру хромосом наибольшее совпадение было выявлено при сравнении молекулярных кариотипов ЭБ и ТЭ, что подтверждает эффективность используемой в настоящее время биопсии ТЭ в ПГС.

Сравнительное молекулярное кариотипирование вндНК из внутриполостной жидкости бластоцисты и клеток ЭБ и ТЭ показало отсутствие полного соответствия кариотипов. Эти результаты расходятся с данными других исследовательских групп. В одной из работ результаты сравнительного кариотипирования вндНК и клеток ТЭ показали полное, частичное совпадение, либо его отсутствие в 82%, 15,4% и 2,6% случаев соответственно [4]. В другом исследовании сравнение молекулярных кариотипов вндНК и ДНК из клеток не разделявшихся ЭБ и ТЭ показало полное соответствие лишь в 48% случаев [16]. В некоторой степени наблюдаемые различия можно объяснить тем, что в нашем исследовании впервые было применено разделение тканей, благодаря чему появилась возможность молекулярно-цитогенетически проанализировать 3 различных типа образцов от одной бластоцисты. В результате использования такого подхода при сравнении кариотипов нами были выявлены РА, которые представляют собой трисомии и моносомии по одной и той же паре гомологичных хромосом и являются результатом постзиготического хромосомного нерасхождения. В том случае, если в бластоцисте или биоптате ТЭ присутствуют два равно представленных клеточных клона с РА, они могут стать причиной снижения частоты выявления анеуплоидий методом CGH и возникновения диагностических ошибок. Таким образом, разделение тканей и молекулярное кариотипирование вндНК дало нам возможность на 64% увеличить вероятность обнаружения РА, позволив с высокой степенью вероятности определить анеуплоидии, сформировавшиеся в результате постзиготических митотических ошибок (50/175 мутаций, 29%). С точки зрения ПГС в ходе циклов ЭКО, обнаружение анеуплоидии во внутриполостной жидкости, либо ТЭ может указывать на наличие реципрокной аномалии в ЭБ. Таким образом, использование вндНК в ПГС как единственного и самостоятельного источника информации о кариотипе эмбриона вряд ли представляется возможным, пото-

му что это может привести к появлению ложноположительных результатов. Действительно, в настоящей работе были обнаружены бластоцисты, у которых анеуплоидии выявлялись только при анализе вДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты, тогда как ТЭ и ЭБ имели нормальный кариотип (№ 18, 23 в табл. 1). В таком случае часть эуплоидных эмбрионов может быть ошибочно исключена для переноса по результатам диагностики, основанной только на использовании вДНК.

### Выводы

Анализ вДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты человека дает заметный вклад в понимание цитогенетических механизмов формирования постзиготических митотических анеуплоидий, являющихся одной из причин образования хромосомного мозаицизма на начальных этапах эмбрионального развития. ВДНК может быть успешно амплифицирована и проанализирована современными молекулярно-цитогенетическими методами. Результаты сравнительного анализа внеклеточной ДНК, клеток ЭБ и ТЭ в целом свидетельствуют о недооценке частоты анеуплоидных и мозаичных бластоцист. Кариотипы ЭБ и ТЭ часто оказываются не идентичными, что говорит о невозможности прямой экстраполяции результатов ПГС клеток ТЭ на ЭБ. Таким образом, вДНК в полости бластоцисты можно рассматривать как ценный дополнительный, но не самостоятельный источник информации о кариотипе эмбриона.

### Список литературы

1. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344:768-770.
2. Montag M, Koster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. Review article. *Fertil Steril*. 2013;100(3): 603-607.
3. Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I et al. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(1): 2-8.
4. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril*. 2014;102(6): 1692-1699. e6.
5. Harper JC, Coonen E, De Rycke M et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: Cycles from January to December 2007

with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod. Hum. Reprod.* 2010;25(11):2685-2707.

6. Harton GL, Magli MC, Lundin K et al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group-best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod*. 2011;26(1):41-46.

7. Chow JF, Yeung WS, Lau EY et al. Array comparative genomic hybridization analyses of all blastomeres of a cohort of embryos from young IVF patients revealed significant contribution of mitotic errors to embryo mosaicism at the cleavage stage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(1):105. DOI: 10.1186/1477-7827-12-105.

8. Mertzaniidou A, Spits C, Nguyen HT et al. Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1716-1724.

9. Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod*. 1998;13:3151-3155.

10. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:944-949.

11. Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(11):1439-1444.

12. Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N. et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nature communications*. 2016;7:11165. DOI:10.1038/ncomms11165.

13. Lledo B, Morales R, Ortiz JA et al. Implantation potential of mosaic embryos. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63(3):206-208. DOI: 10.1080/19396368.2017.1296045.

14. Bazrgar M, Gourabi H, Valojerdi MR et al. Self-correction of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(17):2449-2456.

15. Palini S, Galluzzi L, DeStefani S et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6):603-610.

16. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R et al. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril*. 2015;104(2):418-425.

17. Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:1921-1930.

18. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update*. 2014;20: 571-581

19. Gleicher N, Vidali A, Braverman J et al. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):54.

20. Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011;17:620-627.