

На правах рукописи



ФОНОВА ЕЛИЗАВЕТА АЛЕКСЕЕВНА

**МОДИФИЦИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ
НА ПРОЯВЛЕНИЕ НЕСБАЛАНСИРОВАННЫХ ХРОМОСОМНЫХ
ВАРИАНТОВ ПРИ НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКЦИИ У ЧЕЛОВЕКА**

1.5.7 Генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН
Лебедев Игорь Николаевич

Официальные оппоненты:

Черных Вячеслав Борисович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», лаборатория генетики нарушений репродукции, заведующий (г. Москва)

Демикова Наталия Сергеевна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра медицинской генетики, заведующий (г. Москва)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «___» _____ 2024 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Назаренко Мария Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Инактивация X-хромосомы (XCI – X chromosome inactivation) – процесс, посредством которого одна из двух X-хромосом эмбриона женского пола подвергается транскрипционному молчанию, происходит в раннем эмбриогенезе. Известно, что у человека в норме инактивация происходит случайным образом между двумя X-хромосомами и имеет равновероятный характер. В результате 50% клеток содержат активную X-хромосому от матери, а 50% клеток – от отца. Однако в некоторых случаях встречается и избирательная (асимметричная) инактивация (sXCI – skewed X-chromosome inactivation), когда преимущественно инактивируется X-хромосома одного из родителей. Часто смещение инактивации бывает связано с X-сцепленными формами патологий [Bajic V. et al., 2016; Viggiano E. et al., 2016; Сурин В.Л. и др., 2018; Лялина А.А. и др., 2021]. Причиной формирования асимметричной инактивации могут быть мутации в генах, отвечающих за сам процесс инактивации (*XIST*, *XAIST* и др.), но такие случаи весьма редки [Plenge R.M. et al., 1997]. Дополнительный источник sXCI – это вторичное смещение инактивации, когда первоначально инактивация происходит равновероятно, но затем, по ряду причин, преимущество в жизнеспособности или скорости деления получает пул клеток с активной X-хромосомой одного из двух родителей. Возможно, что одной из причин формирования вторичной sXCI являются как крупные, так и непротиворечивые несбалансированные структурные хромосомные варианты (CNV – Copy Number Variation), которые могут привести к клиническим последствиям для здоровья или репродуктивных способностей женщины. В исследовании по изучению механизма инактивации X-хромосомы на эмбриональных стволовых клетках человека было показано, что в группе с равновероятной XCI средний суммарный процент CNV в геноме по размеру составил 0,13%; в то время как в группе с sXCI количество CNV составило 0,38% [Luo Y. et al., 2014]. В настоящее время выявлены некоторые микроструктурные перестройки, которые связаны с эмбриолетальностью у человека. Так Pergeraro с соавторами описали большую семью, в которой делеция в Xq28 была связана как с sXCI, так и с повторяющимися выкидышами [Pergeraro E. et al., 1997]. Однако такие исследования до сих пор остаются единичными. Для адекватной интерпретации биологической значимости CNV необходимо установить локализацию, генный состав и статус наследования хромосомного варианта, поэтому исследования CNV необходимо проводить не только в клетках эмбрионов, но и у их родителей.

Асимметричная инактивация X-хромосомы у женщины также может быть связана с привычным невынашиванием беременности [Su Y. et al., 2015]. Наличие у женщины X-сцепленной хромосомной микроперестройки, влияющей на жизнеспособность эмбриона, может в некоторых случаях привести к рождению потомка с той же X-сцепленной перестройкой. Но перед этим у женщины может произойти несколько самопроизвольных выкидышей. Всё это время причина невынашивания беременности будет не установлена, что приведет к диагнозу «идиопатическое невынашивание беременности». Поэтому использование такого эпигенетического маркера, как асимметричная инактивация X-хромосомы для женщин с невынашиванием беременности и пренатально погибших эмбрионов может позволить сузить выборку для выявления X-сцепленных CNV, которые

нарушают нормальный эпигенетический процесс инактивации X-хромосомы, а также вносят вклад в эмбриональную гибель. Установление причины невынашивания, связанное с носительством CNV на X-хромосоме, открывает перспективы родить здорового ребенка с использованием вспомогательных репродуктивных технологий и преимплантационного генетического тестирования.

Степень научной разработанности темы исследования. К настоящему времени инактивация X-хромосомы является объектом изучения как нормальный эпигенетический процесс, так и как один из факторов, приводящий к картине неполной пенетрантности генетических вариантов. Изучение процесса инактивации X-хромосомы постепенно продвинулось от создания животных моделей до создания модели *in vitro* на клеточных культурах: эмбриональные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные клетки [Nichols J., Smith A., 2009; Tchieu J. et al., 2010; Nazor K.L. et al., 2012; Mekhoubad S. et al., 2012; Богомазова А.Н. и др., 2015; Vallot C. et al., 2015; Petropoulos S. et al., 2016; Пристяжнюк И.Е., Мензоров А.Г., 2017; Patel S. et al., 2017; Панова А.В. и др., 2020]. Однако для человека некоторые методы неприменимы ввиду межвидовых различий (животные модели) или по причине такого явления как эрозия неактивной X-хромосомы из-за длительного культивирования.

Несмотря на то, что изучение асимметричной инактивации X-хромосомы в патогенезе отдельных заболеваний продолжается уже давно, на сегодняшний день остается неясным феномен повышенной частоты sXCI при определенных нозологиях. Еще в 2001 году Lanasa M.C. с соавторами предположили, что выявленные летальные X-сцепленные мутации у мужчин могут быть ассоциированы с асимметричной инактивацией у их матерей - носителей аналогичных генетических вариантов [Lanasa M.C. et al., 2001]. Это может объяснить проявление двух патологических состояний: невынашивание беременности у женщины-носительницы по причине внутриутробной летальности эмбрионов с X-сцепленной мутацией и рождение детей с наличием X-сцепленной патологии у потомков мужского пола и у девочек с равновероятной инактивацией. Однако до настоящего времени отсутствуют достоверные данные, какие именно мутации могут привести к такому феномену, либо же это случайное событие. Так, по данным мета-анализа Su M. с соавторами, на 2011 год было опубликовано только 12 исследований, в которых изучали связь инактивации X-хромосомы с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и в большинстве исследований было показана повышенная частота XCI у женщин с ПНБ, по сравнению с контрольными группами [Su M.T. et al., 2011]. Однако ни в одном из исследований не был проведен поиск причины или определен механизм выявленной ассоциации sXCI и ПНБ.

Благодаря развитию высокоразрешающих молекулярно-генетических технологий и их внедрению в клиническую практику получены новые знания о причинах невынашивания беременности. Проведенные исследования показывают необходимость генетического тестирования как семейных пар с невынашиванием, так и их абортивного материала с целью персонализированного подхода к профилактике наследственных заболеваний [Rajcan-Separovic E. et al., 2010; Bagheri H. et al., 2015; Wen J. et al., 2015; Finley J. et al., 2022; Byrne et al., 2023]. При этом нет работ, изучающих проблему

невынашивания беременности, где выявленные X-сцепленные хромосомные варианты (CNV) у женщин-носительниц и их абортного материала были бы сопоставлены со статусом инактивации X-хромосомы.

Цель исследования: установить модифицирующую роль инактивации X-хромосомы в проявлении микроделений и микродупликаций хромосом при невынашивании беременности и нарушении эмбрионального развития человека.

Задачи исследования:

1. Определить частоту асимметричной инактивации X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности и спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX.
2. Провести секвенирование генов *XIST* и *XACT* для выявления патогенных вариантов при асимметричной инактивации X-хромосомы.
3. Провести поиск и оценить распространенность несбалансированных микроструктурных хромосомных перестроек на X-хромосоме у женщин и абортусов с нормальным кариотипом с асимметричной инактивацией X-хромосомы.
4. Определить статус метилирования регионов X-хромосомы с хромосомными микроделениями при наличии асимметричной X-инактивации.
5. Разработать алгоритм диагностики несбалансированных микроструктурных хромосомных перестроек на X-хромосоме в семьях с невынашиванием беременности.

Научная новизна.

В рамках данной работы показано, что смещение инактивации X-хромосомы статистически значимо чаще регистрируется среди женщин с невынашиванием беременности, чем у женщин без проблем с репродукцией. Впервые установлено, что асимметричная инактивация X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе в 30% случаев сопровождается наличием CNV на X-хромосоме. Выявленные CNV на X-хромосоме представляют собой микродупликации в регионах Xq28 и микроделения в регионах Xp11.23 и Xq24. В регионах этих микроструктурных перестроек локализованы гены, мутации в которых участвуют в формировании X-сцепленных форм умственной отсталости, а также могут приводить к эмбриональной гибели. Уменьшенная или повышенная доза этих генов может привести к сдвигу инактивации X-хромосомы у матери и гибели ее эмбрионов мужского пола либо женского, если X-хромосома с CNV остается активной.

Впервые проведено таргетное секвенирование генов *XIST* и *XACT*, что позволило исключить эффект первичного нарушения инактивации X-хромосомы. Выявленные спектры SNP в генах *XIST* и *XACT* у женщин с sXCI представляют собой варианты с неясной клинической значимостью, что не исключает их возможной патогенности. Поиск однонуклеотидных замен в когорте женщин с асимметричным уровнем инактивации X-хромосомы, которые могли повлиять на функции генов *XIST* и *XACT*, ранее не проводился.

Впервые выполнено таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование региона микроделения Xq24 у женщин-носительниц с sXCI, продемонстрировавшее неметилированное состояние X-хромосомы дикого типа (без делеции).

Показано, что проведение молекулярно-генетической диагностики с целью определения уровня инактивации X-хромосомы может быть дополнительным скрининговым методом для профилактики наследственных заболеваний, в том числе на

уровне пренатальной и пренатальной диагностики, что позволит обеспечить качественное медико-генетическое консультирование семей

Теоретическая и практическая значимость. В данной работе выявлен спектр патогенных CNV на X-хромосоме у женщин с sXCI, которые могут привести к невынашиванию беременности. Впервые экспериментально доказана преимущественная инактивация X-хромосомы с микроделецией региона Xq24 у женщин-носительниц с помощью определения статуса метилирования в регионе мутации, что объясняет бессимптомное носительство микроструктурных хромосомных вариантов и отсутствие клинических проявлений.

По результатам исследования разработан алгоритм диагностики X-сцепленных CNV у женщин с невынашиванием беременности. Алгоритм был применен в двух клинических случаях диагностики микроделеции Xq24. В первом случае в двух беременностях была проведена пренатальная диагностика у плодов от женщины-носительницы микроделеции. По результатам пренатальной диагностики в обоих случаях было исключено носительство микроделеции у плодов женского пола. Во втором случае для женщины-носительницы с привычным невынашиванием беременности была разработана и реализована схема преимплантационного генетического тестирования.

Методология и методы исследования. В основе данной научной работы лежит применение современных молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов с целью поиска причин невынашивания беременности в группе семей с потерей беременности и нормальным кариотипом эмбриона. Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Было получено разрешение комитета по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 9 от 26.11.2018 года).

С целью исключения формирования первичной асимметричной инактивации X-хромосомы во всех выявленных случаях sXCI проведено определение нуклеотидной последовательности генов *XIST* и *XACT* методом массового параллельного секвенирования.

С помощью матричной сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (array CGH) у женщин с sXCI проведён поиск микроструктурных вариаций копияности ДНК. Высокая разрешающая способность использованной технологии позволила обнаружить субмикроскопические хромосомные aberrации, не выявленные при стандартном кариотипировании. Инструментом для интерпретации результатов, полученных с помощью хромосомного микроматричного анализа, и определения клинической значимости идентифицированных CNV явилась работа с базами данных DGV, OMIM, DECIPHER.

С целью подтверждения обнаруженных вариаций числа копий ДНК у пациентов и установления их происхождения был использован метод ПЦР в режиме реального времени с подбором праймеров для исследуемых локусов, а также метод мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA). Для больных, имеющих верифицированные патогенные и вероятно патогенные микродупликации, проведён анализ клинических признаков с привлечением данных литературы.

Для оценки статуса инактивации мутантной X-хромосомы с микроделецией региона Xq24 у женщины проведено бисульфитное секвенирование продуктов ПЦР внутри региона микроделеции. Обнаружен низкий уровень метилирования CpG-сайтов, которые метилируются на инактивированной хромосоме, указывая на то, что активным является именно гомолог дикого типа, не несущий микроделеции.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica 12 (StatSoft). Проверка соответствия закону нормального распределения проводилась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные данные не подчинялись закону нормального распределения. Для сравнительного анализа отдельных групп применялись точный критерий Фишера и критерий Хи-квадрат (χ^2) в зависимости от размера выборки. Если в выборке было менее 5 наблюдений, использовали точный тест Фишера. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Анализ данных бисульфитного секвенирования был проведен с использованием количества конверсий цитозина в тимин в считываниях секвенирования и последующего количественного определения доли метилирования каждого цитозинового основания. Для этого было выполнено выравнивание прочтений последовательностей ДНК, обработанных бисульфитом, с эталонным геномом; идентификация преобразованных и неконвертированных выровненных прочтений; деление количества метилированных прочтений (с цитозинами) на сумму прочтений (с цитозинами или тиминами). Для анализа результатов секвенирования проводили контроль качества необработанных данных с использованием FastQC (FastQC, RRID: SCR_014583). Выравнивание и последующий анализ проводили с помощью пакета программ Bismark (Bismark, RRID:SCR_005604). Визуализацию и объединение результатов биоинформатического анализа образцов в единый отчет проводили с помощью MultiQC (MultiQC, RRID: SCR_014982).

Положения, выносимые на защиту:

1. Женщины с невынашиванием беременности характеризуются повышенной частотой асимметричной инактивации X-хромосомы, по сравнению с группой женщин без проблем с репродукцией.
2. Асимметричная инактивация X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе в 30% случаев сопровождается носительством CNV на X-хромосоме.
3. В области CNV у женщин с асимметричной инактивацией X-хромосомы и невынашиванием беременности локализованы гены, ответственные за жизнеспособность и пролиферацию клеток, а также гены, варианты в которых связаны с нарушением интеллектуального развития.
4. Модификация фенотипического проявления хромосомных микроделений, локализованных на X-хромосоме, происходит за счет преимущественной инактивации мутантной X-хромосомы.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Высокая степень достоверности данных, полученных в ходе выполнения настоящей работы, обеспечивается исследованием репрезентативных клинических и контрольных выборок, применением современных молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и

биоинформатических методов исследования с верификацией полученных экспериментальных данных, а также статистической обработкой полученных результатов.

Апробация материалов диссертации. Результаты исследования были представлены в виде устных докладов на 8 конференциях: на межрегиональной конференции «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (5-6 сентября 2019 г., г. Новосибирск); на Всероссийской конференции «Генетика человека и патология: Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (20-22 ноября 2019 г., г. Томск); на Всероссийской второй научно-практической онлайн-конференции РОМГ «Новые технологии в диагностике и лечении наследственных болезней» (20-21 октября 2020 г., г. Москва); на Межрегиональной конференции «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (19-20 ноября 2020 г., г. Томск); на IX Съезде Российского общества медицинских генетиков (30 июня – 2 июля 2021 г., г. Москва); на Всероссийской конференции «Новые технологии в диагностике и лечении наследственных болезней» (19-20 октября 2021 г., г. Москва); на Межрегиональной конференции «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (26-27 мая 2022 г., г. Томск), на XIII научной конференции «Генетика человека и патология», посвященной 40-летию НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (20-22 ноября 2022 г., г. Томск).

Публикации. По теме исследования опубликовано 13 работ, в том числе 6 статей в журналах Перечня ВАК РФ, из них 3 статьи в журналах, реферируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 7 публикаций – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты настоящего исследования получены автором либо самостоятельно, либо в ходе совместной работы с коллегами из лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Изучение литературы по теме, экспериментальная работа, анализ и обобщение результатов, написание диссертационной работы выполнены лично автором. Автор участвовал во всех этапах обсуждения полученных результатов и их опубликования.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список сокращений, список литературы, список иллюстративного материала и 1 приложение. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 13 таблицами. Библиография включает 177 литературных источников, из них 18 источников отечественной литературы, 159 источников зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили ткани абортивного материала (экстраэмбриональная мезодерма), полученные от 94 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX и 64 индуцированных (медицинских) абортусов с кариотипом 46,XX, а также лимфоциты периферической крови, полученные от 448 женщин (313 женщин с невынашиванием беременности и 135 женщин без проблем с репродукцией). От всех пациентов было получено информированное согласие на участие в научном исследовании.

Дизайн диссертационного исследования представлен на рисунке 1.

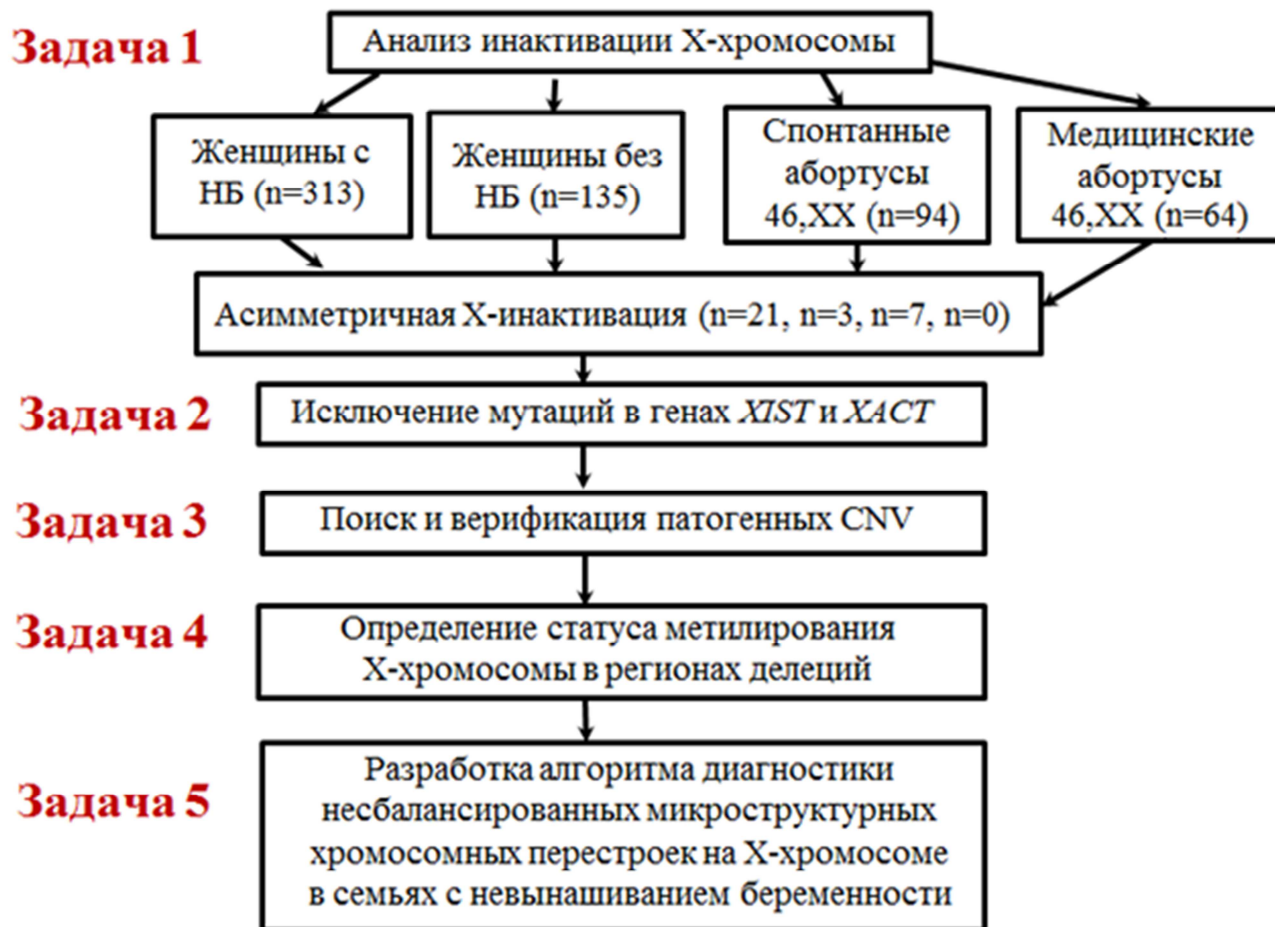


Рисунок 1 – Дизайн исследования.

В ходе первого этапа исследования для всех исследуемых групп проведен анализ характера инактивации X-хромосомы с использованием метил-чувствительной ПЦР и последующего фрагментного анализа на генетическом анализаторе.

На втором этапе для всех случаев выявленной асимметричной инактивации X-хромосомы проведен поиск патогенных вариантов генов *XIST* и *XACT* у женщин с помощью таргетного секвенирования нового поколения (NGS).

На третьем этапе работы для всех случаев выявленной асимметричной X-инактивации проведен поиск несбалансированных микроструктурных хромосомных вариантов с помощью метода array-CGH на микроматрицах SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K (Agilent Technologies, США). Верификация патогенных вариантов и установление характера их наследования проводились с помощью ПЦР в режиме реального времени и MLPA. Для интерпретации клинической значимости хромосомных и генных вариантов использовали следующие базы данных: DECIPHER, DGV, ECARUCA, PubMed, OMIM, Orphanet, Human Phenotype Ontology, Human Gene Mutation Database, ClinVar, dbSNP, gnomAD, 1000 Genomes Project, Great Middle East Allele frequencies (GME), HGVS.

На четвертом этапе работы для определения статуса инактивации X-хромосомы с мутацией, для женщин-носительниц микроделеции Xq24 с sXCI проведен эксперимент по определению статуса метилирования в регионе мутации с помощью бисульфитного секвенирования продуктов ПЦР внутри регионов CNV.

Все экспериментальные работы были проведены на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биоколлекции «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ характера инактивации X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности

Характер инактивации X-хромосомы был проанализирован у 313 женщин с невынашиванием беременности, гетерозиготных по первому экзону гена рецептора андрогена (*AR*). Также была исследована инактивация X-хромосомы у 135 женщин без проблем с репродукцией, имевших в анамнезе две и более благополучно завершившиеся беременности. В группе женщин с невынашиванием беременности частота асимметричной ХСІ была статистически значимо выше (6,7%), чем у женщин без проблем с репродукцией (2,2%, $p=0,019$). В литературе было показано, что в нормальной популяции избирательная инактивация одной из родительских X-хромосом встречается у 1,5–4% здоровых женщин [Sullivan A.E. et al., 2003; Kuo P.L. et al., 2008], а у женщин с привычным невынашиванием беременности частота sХСІ может достигать 16-17% [Bagislar S. et al., 2006; Kuo P.L. et al., 2008; Sui Y. et al., 2015].

Частота смещения инактивации X-хромосомы в группе женщин с ПНБ была выше (8,2%), чем у женщин с единственной потерей беременности в анамнезе (5,1%), однако, эти различия не были статистически значимы ($p=0,26$). Таким образом, была сформирована выборка из 24 женщин с sХСІ для дальнейшего анализа.

Исследование статуса инактивации X-хромосомы у спонтанных абортусов

Анализ характера инактивации был проведен во внезародышевой мезодерме у 94 спонтанных абортусов I триместра беременности с кариотипом 46,XX и у 64 медицинских абортусов I триместра от женщин, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность. Частота асимметричной инактивации в группе спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX составила 7,4%, тогда как в группе контроля не было выявлено ни одного случая асимметричной инактивации X ($p=0,04$). Одним из возможных объяснений sХСІ у СА с кариотипом 46,XX может быть смещение инактивации X-хромосомы в сторону гомолога дикого типа, тогда X-сцепленная мутация может проявиться и привести к ранней гибели эмбриона.

Идентификация патогенных вариантов в генах *XIST* и *XACT* с использованием целевого секвенирования нового поколения

Секвенирование генов *XIST* и *XACT* проведено у женщин с асимметричной sХСІ (18 женщин с невынашиванием беременности и 3 женщины контрольной группы). Для 3 женщин с невынашиванием беременности и sХСІ не удалось получить достаточное количество продукта ПЦР для секвенирования из-за деградации ДНК.

Анализ результатов секвенирования генов *XIST* и *XACT* проводили с использованием баз данных dbSNP (avsnr150) и HGVS. Всего для гена *XIST* было идентифицировано 107 однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP), из которых 33 SNP находились в

экзонах и 74 SNP в интронах. Для гена *XACT* было идентифицировано всего 15 SNP, из которых 14 были локализованы в интронах и только 1 в экзоне (rs10690888). Выявленные спектры SNP в генах *XIST* и *XACT* у женщин с sXCI представляют собой варианты с неясной клинической значимостью, что не исключает их возможной патогенности. Ранее в литературе не проводился поиск возможных однонуклеотидных замен в когорте женщин с асимметричным уровнем инактивации X-хромосомы, которые могли повлиять на функции генов *XIST* и *XACT*. Таким образом, у 21 женщины была исключена первичная асимметричная инактивация X-хромосомы.

Поиск вариаций числа копий ДНК у женщин и спонтанных абортусов с sXCI

Поиск CNV был проведен с помощью метода матричной сравнительной геномной гибридизации на микрочипах SurePrint G3 Human CGH array 4×180K (Agilent Technologies, США) для всех случаев sXCI более 90% – для 21 женщины с невынашиванием беременности и 3 женщин из контрольной группы, а также 7 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX.

Для 7 спонтанных абортусов с sXCI не было выявлено ни одной X-сцепленной CNV. У 6 женщин с невынашиванием беременности и 2 женщин из контрольной группы были обнаружены CNV как на аутосомах, так и на X хромосоме (таблица 1). Выявленные CNV на X-хромосоме представляли собой микродупликации в регионах Xp22.33 и Xq28 и микроделеции в регионах Xp11.23 и Xq24.

Была проведена верификация X-сцепленных CNV у женщин и анализ сегрегации микроперестроек у их потомков с помощью ПЦР в реальном времени и мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA). Для выявления CNV в регионе Xp22.33 ПЦР в реальном времени является неинформативной, поэтому была осуществлена их верификация с помощью MLPA. По результатам MLPA были исключены дупликации в регионе Xp22.33. Для подтверждения остальных CNV использовалась количественная ПЦР в режиме реального времени. Таким образом, были обнаружены и подтверждены микродупликации в регионе Xp28 и микроделеции в регионах Xp11.23 и Xq24.

Проведено сравнение списка подтвержденных CNV с DGV и базой данных хромосомного дисбаланса и фенотипа у человека с использованием баз данных Ensembl Resources (DECIPHER). Аннотацию генов, локализованных в регионах CNV, проводили с использованием баз данных NCBI и Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), а также источников литературы. Для интерпретации частоты, клинической значимости и патогенности выявленных микроструктурных перестроек были использованы данные НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. В анализ вошли данные 450 индивидов, полученные в результате анализа геномов с использованием микроматриц «Infinium Multi-Ethnic Global-8 Kit». По результатам сопоставления данных выборки этно-территориальных групп населения России и Средней Азии и выявленного спектра CNV у женщин с sXCI не было обнаружено ни одной пересекающейся микроструктурной хромосомной перестройки, что свидетельствует в пользу вероятной патогенности выявленных CNV для невынашивания беременности.

Таблица 1 - Спектр CNV у женщин с sXCI

Код семьи	Возраст	Анамнез	XCI в лимф (%)	aCGH, (ISCN 2020)	Размер	Кариотип абортуса	XCI (%) в экстраэмб. мезодерме	X-сцепленная CNV у абортуса
PLG1	26	2 неразвивающиеся беременности	96	arr[GRCh37] 3p22.3(35693683_35744834)×3	51 kb	46,XX	72	материнского происхождения
				arr[GRCh37] Xp11.23(47881447_47932977)×1	52 kb			
PLG2	29	7 неразвивающихся беременностей, 1 медицинский аборт	100	arr[GRCh37] Xq24(118555586_118794279)×1	239 kb	46,XX	70	материнского происхождения
						46,XY	-	материнского происхождения
						46,XY	-	материнского происхождения
PLG3	32	2 неразвивающиеся беременности	90	arr[GRCh37] Xq28(154976660_155232214)×3	255,6 kb	-	-	-
PLG4	30	1 неразвивающаяся беременность	95	arr[GRCh37] 10p15.3(136361_536763)×3	400 kb	46,XX	73	нет
				arr[GRCh37] 11q24.3-q25 (130413533_134934196)×3	4,5 Mb			
				arr[GRCh37] Xq28(154976684_155232907)×3	256 kb			
PLG5	25	1 неразвивающаяся беременность	97	arr[GRCh37] Xq28(153666039_153666485)×3	447 bp	46,XY	-	материнского происхождения
PLG6	22	1 неразвивающаяся беременность	95	arr[GRCh37] 6q27(170072080_170911240)×3	839,2 kb	46,XX	гомозигота по AR	материнского происхождения
				arr[GRCh37] 7q36.3(157748575_159128556)×3	1,38 Mb			
				arr[GRCh37] Xq28(154450164_155232907)×3	782,7 kb			
CG1	35	2 живорожденных детей	94	arr[GRCh37] Xq24(117509030_117545557)×1	36,53 kb	-	-	-
CG2	30	1 живорожденный ребенок	90	arr[GRCh37] Xq28(153666039_153666485)×3	447 bp	-	-	-

Проведен анализ обогащения генов в регионах выявленных X-сцепленных CNV (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/enrich>) и показано, что наиболее представленной является группа генов, патогенные варианты в которых являются причиной умственной отсталости (таблица 2).

Таблица 2 - Анализ обогащения генов в регионах выявленных X-сцепленных CNV

Заболевание	p-value	Гены
Умственная отсталость	0,0043	<i>RAB39B</i> (OMIM#300774) <i>UBE2A</i> (OMIM#312180) <i>LICAM</i> (OMIM#308840) <i>CLIC2</i> (OMIM #300138) <i>CXorf56</i> (OMIM#301013) <i>GDII</i> (OMIM #300815)

Для установления клинического значения CNV необходимо использовать совокупность критериев, таких как размер перестройки, генный состав, происхождение аберрации, а также клинические сведения о пациенте и его семье, данные биоинформационных ресурсов. CNV определяются как полиморфные варианты в случае, если они зарегистрированы не менее чем у 1% индивидов в общей популяции.

Выявленные микродупликации в регионе Xq28 и микроделеция в регионе Xq24 (Xq24 (117509030_117545557)×1)) встречались у женщин из контрольной группы, не имеющих проблем с репродукцией. Однако микроделеция в регионе Xq24 размером 239 т.п.н., затрагивающая 8 генов: *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5*, *CXorf56*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPT6*, *MIR766*, была обнаружена только у женщины PLG2 с ПНБ (рисунок 2).

Было проведено исключение возможного носительства микроделеции Xq24 в контрольной группе, состоящей из 130 женщин без проблем с репродукцией, имеющих не менее двух благополучно завершившихся беременностей, и с равновероятным характером ХСІ. Поиск микроструктурных перестроек проводился с использованием ПЦР в режиме реального времени с праймерами на гены *UBE2A*, *SEPT6* и *SLC25A43*. В группе контроля не обнаружено ни одного случая изменений копийности участка. Эти данные свидетельствуют в пользу предполагаемой патогенной значимости аберрации в нарушении эмбрионального развития.

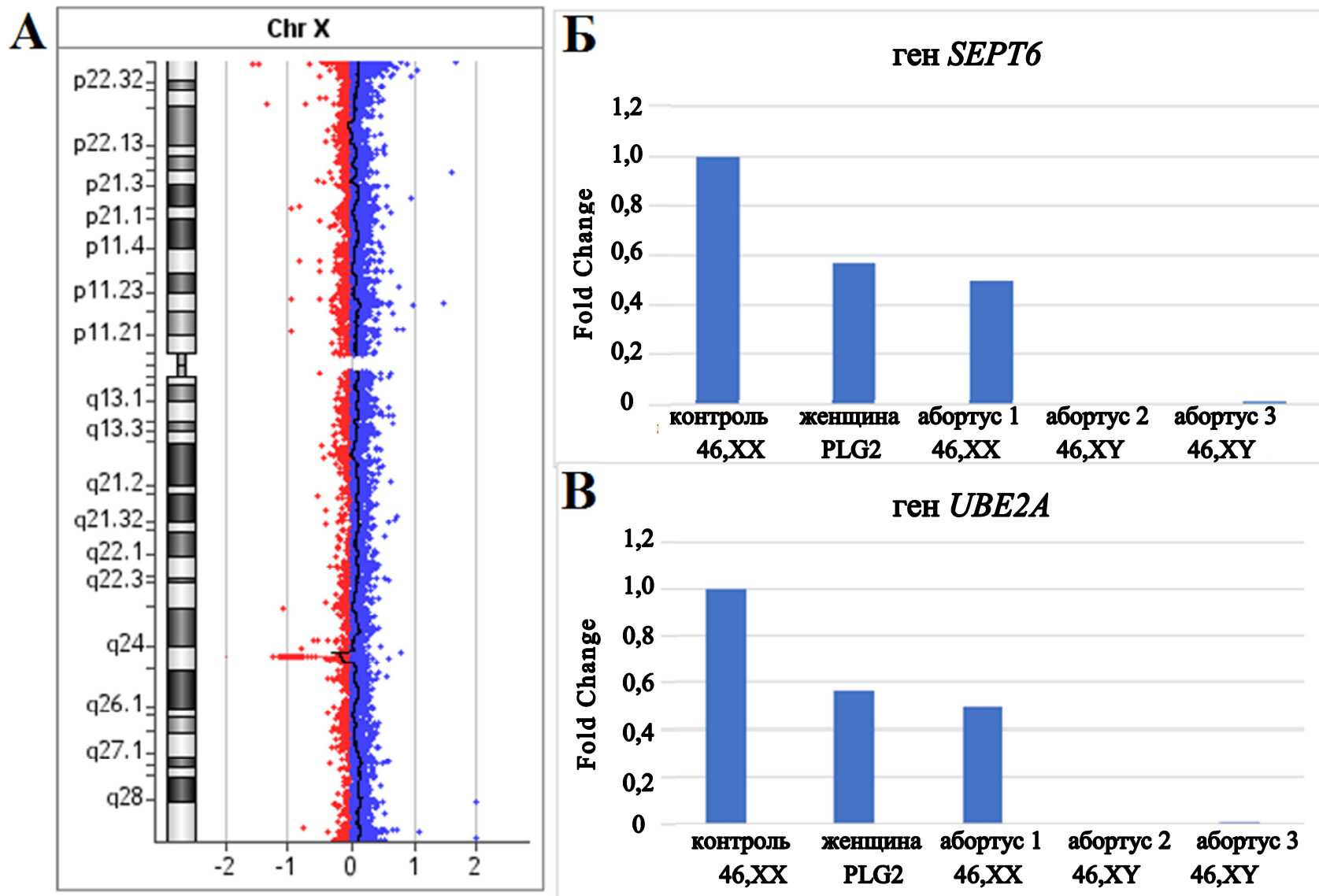


Рисунок 2 - Микроделеция Xq24 в семье PLG2. А – результат агау-СН, Б – результат ПЦР в режиме реального времени (ген *SEPT6*), В – результат ПЦР в режиме реального времени (ген *UBE2A*).

Более того, анализ микроделеции Xq24 у женщины PLG2 показал, что микроделеция этого региона связана с редкой синдромальной формой X-сцепленной умственной отсталости – синдромом дефицита *UBE2A*, тип Nascimento (OMIM#300860). Это заболевание характеризуется интеллектуальной недостаточностью от умеренной до тяжелой степени и различными дисморфиями. Синдром дефицита *UBE2A* является очень редким X-сцепленным заболеванием, до настоящего времени было опубликовано только 12 случаев различных вариантов внутригенных мутаций в гене *UBE2A* и 9 случаев протяженных делеций (рисунок 3) [Nascimento R.M.P. et al., 2006; Budny B. et al., 2010; Honda S. et al., 2010; De Leeuw N. et al., 2010; Haddad D.M. et al., 2013; Tucker T. et al., 2013; Czeschik J.C. et al., 2013; Thunstrom S. et al., 2015; Tsurusaki Y. et al., 2017; Tolmacheva E.N. et al., 2020].

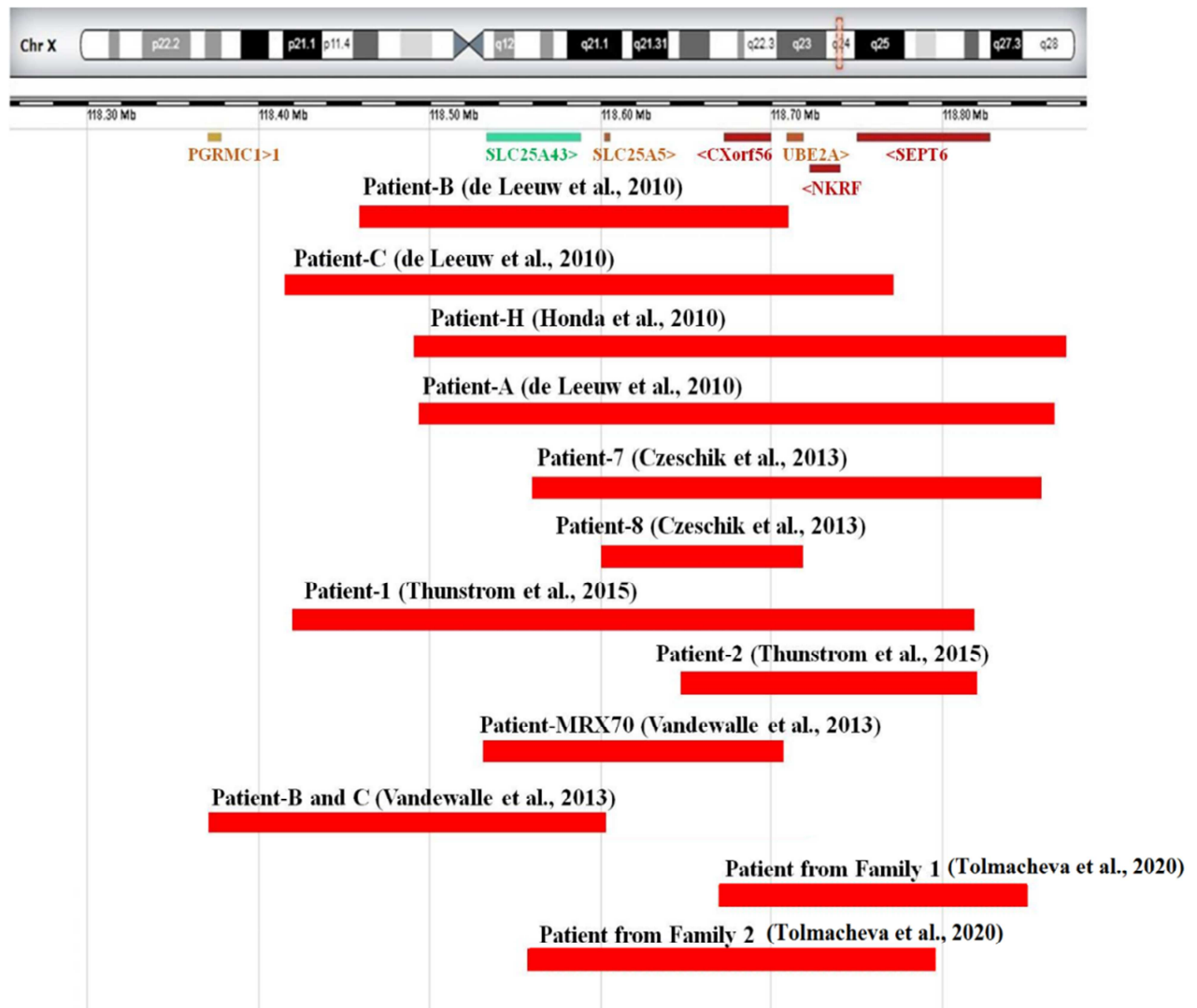


Рисунок 3 - Спектр делеций в Xq24 у пациентов с синдромом Насименто.

В семьях с мутациями, затрагивающими ген *UBE2A*, были больны все мужчины с мутантной X-хромосомой, а женщины-носительницы всегда были здоровы, но имели 98-100% смещение инактивации X-хромосомы [Czeschik J.C. et al., 2013; Thunstrom S. et al., 2015]. Все описанные в литературе пациенты с гемизиготной мутацией гена *UBE2A*, независимо от типа мутации (внутригенная или большая делеция), имеют

интеллектуальную недостаточность от умеренной до тяжелой формы с отсутствующей или очень плохой речью [Thunstrom S. et al., 2015].

Определение статуса инактивации X-хромосомы с несбалансированными хромосомными вариантами у женщин-носительниц и у спонтанных абортусов

Для оценки статуса инактивации X-хромосомы с микроделецией Xq24 проведено бисульфитное секвенирование продуктов ПЦР внутри региона CNV. Предполагалось, что в случае обнаружения низкого уровня метилирования CpG-сайтов, которые метилируются на инактивированной хромосоме, можно будет сделать вывод о том, что активным является гомолог дикого типа.

Кандидатной CNV для проведения эксперимента была выбрана микроделеция Xq24 у женщины PLG2 с sXCI и ПНБ. Данная перестройка затрагивает 8 генов, в том числе гены *CXorf56*, *UBE2A*, ассоциированные с тяжелыми формами X-сцепленной умственной отсталости. Для эксперимента были доступны экстраэмбриональные ткани абортуса (M1) и ДНК женщины-носительницы PLG2, её матери-носительницы (PLG2-7), здоровых сестры (Ж2) и супруга (M4). Кроме того, проанализирована ДНК женщины-носительницы (2192-2) делеции Xq24. В качестве контроля использована ДНК без мутаций в регионе Xq24: 2 образца с кариотипом 46,XY (M2, M3) и 6 образцов с кариотипом 46,XX с установленным уровнем инактивации X-хромосомы (Ж1, Ж3-7), у трех из которых инактивация была более 90% (Ж5-7) (таблица 3).

Таблица 3 - Результаты бисульфитного секвенирования региона Xq24

№	группа	Уровень XCI, %	Средний индекс метилирования
M1 (абортус)	Мужской контроль	0	0
M2		0	0,5
M3		0	0,8
M4 (супруг)		0	0,2
PLG2	delXq24	100	0,3
PLG2-7		100	0
2192-2		100	0
Ж1	Женский контроль	57	45
Ж2 (сестра)		72	15
Ж3		68	57
Ж4		51	62
Ж5		92	51
Ж6		90	38
Ж7		95	86

В результате оценки индекса метилирования по 37 CpG-сайтов в регионе делеции Xq24 у 3 женщин-носительниц с sXCI=100% средний индекс метилирования составил 0,1%, что указывает на преимущественную инактивацию X-хромосомы с делецией Xq24.

Исходя из полученных данных, был разработан алгоритм диагностики и интерпретации X-сцепленных CNV (рисунок 4).

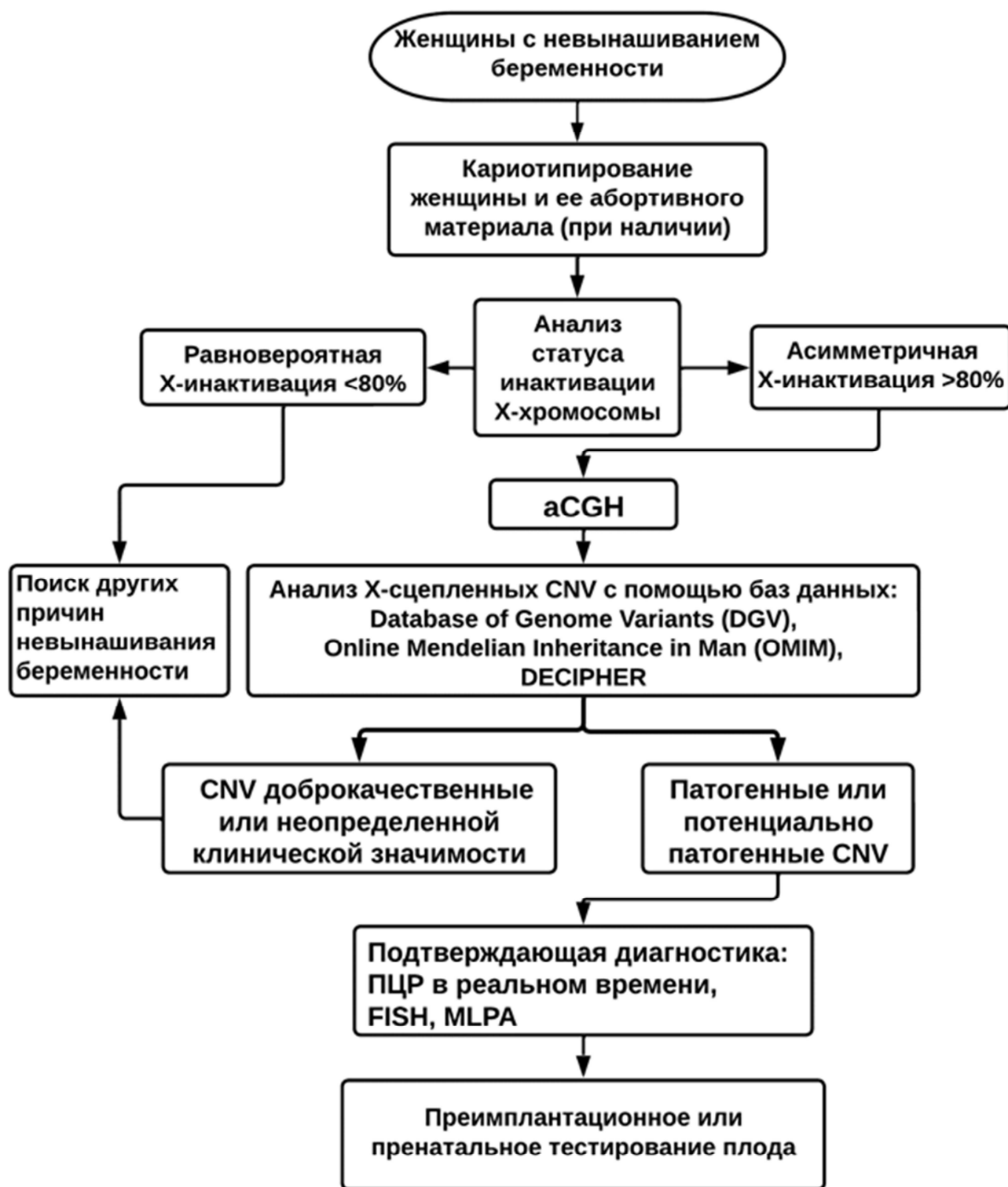


Рисунок 4 - Алгоритм диагностики и интерпретации X-сцепленных CNV у женщин с невынашиванием беременности.

При обращении на консультацию к врачу-генетику пары с невынашиванием беременности на первом этапе обследования необходимо исключить у супругов числовые и крупные структурные хромосомные аномалии с помощью стандартного цитогенетического анализа. Далее в лейкоцитах периферической крови у женщины проводится диагностика статуса инактивации X-хромосомы. Если у женщины наблюдается

асимметричная X-инактивация, ей рекомендуется проведение хромосомного микроматричного анализа. Результаты aCGH требуют обязательного подтверждения альтернативными методами – ПЦР в реальном времени, FISH, MLPA. Выбор метода подтверждающей диагностики зависит от типа (делеция, дупликация) и размера CNV, а также от возможностей лаборатории. Выявленные CNV классифицируют с помощью баз данных – DGV, OMIM, DECIPHER, а также источников литературы. Носительницам патогенных CNV может быть рекомендовано проведение инвазивной пренатальной диагностики в ходе уже наступившей беременности или участие в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с преимплантационным генетическим тестированием с целью исключения у эмбриона унаследованной патогенной CNV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Асимметричная инактивация X-хромосомы вносит свой вклад в патогенез невынашивания беременности. Это явление может быть выявлено у 17,7 % пациенток с ПНБ [Bagislar S. et al., 2006]. Асимметричная XCI может являться маркером X-сцепленных мутаций, летальных для плодов мужского пола. Причина связи между ПНБ и асимметричной XCI неясна, но можно предположить механизм, который может привести к эмбриолетальности. Если у женщины-носительницы X-сцепленной рецессивной летальной мутации и sXCI будет плод мужского пола, то он может унаследовать эту мутацию, что приведет к прерыванию беременности.

Полученные в настоящем исследовании данные основаны на результатах современных высокоразрешающих методов молекулярно-генетического анализа, проведенных в группе женщин с невынашиванием беременности. В работе было показано, что среди женщин с невынашиванием беременности частота асимметричной инактивации X-хромосомы составила 6,7%, что статистически значимо ($p=0,019$) превышает частоту асимметричной инактивации X-хромосомы у женщин без проблем с репродукцией (2,2%). При этом повышенная частота sXCI наблюдалась в группе женщин с привычным невынашиванием по сравнению с женщинами с единственным случаем спонтанного прерывания беременности в анамнезе, однако эти отличия не достигли уровня статистической значимости. Частота асимметричной инактивации в группе спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX составила 7,4%, тогда как в группе контроля не было выявлено ни одного случая sXCI ($p=0,04$).

Так как существуют два пути установления асимметричной инактивации X хромосомы – первичное и вторичное смещение, то в исследовании были изучены оба варианта. Первичное смещение инактивации может быть результатом нарушения работы генов, контролирующих процесс инактивации X хромосомы, из-за мутаций в самих генах. С целью исключения первичного смещения проведено массовое параллельное таргетное секвенирование генов *XIST* и *XACT*, которые являются ключевыми в процессе инактивации X хромосомы у человека. Выявленные в работе спектры SNP в генах *XIST* и *XACT* у женщин с sXCI представляют собой определенный интерес, но существующих на данный момент знаний недостаточно для того, чтобы адекватно оценить клиническую значимость выявленных однонуклеотидных замен.

Ранее не проводился поиск SNP в когорте женщин с sXCI, которые могли повлиять на функции генов *XIST* и *HACT*. Основная информация о работе гена *XIST* на ранних стадиях инактивации X-хромосомы была получена с использованием животных моделей, в том числе и на мышах [Loda A., Heard E., 2019], а учитывая межвидовые различия и особенности инактивации X-хромосомы у тех же мышей, не все данные применимы в отношении человека. Для человека основными методами изучения механизмов работы гена *XIST* являются эксперименты с использованием трансгенов в клеточных культурах [Chow J.C. et al., 2007; Kelsey A.D. et al., 2015] и в стволовых клетках человека [Patrat C. et al., 2020]. Известно, что *XIST* не требуется для поддержания инактивации в неактивной хромосоме [Brown C.J., Willard H.F., 1994], но влияние потери *XIST* на хроматин неактивного гомолога мало изучено. Ген *HACT* специфичен для приматов и мало изучен. Тем не менее, в настоящем исследовании были получены новые знания о вариабельности этих генов у женщин с sXCI.

Так как не было найдено явных патогенных вариантов в генах *XIST* и *HACT*, то вторым этапом было исключение возможных причин формирования вторичной асимметрии с помощью хромосомного микроматричного анализа. Впервые было установлено, что асимметричная инактивация X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе в 30% случаев сопровождается носительством CNV на X-хромосоме. Выявленные CNV на X-хромосоме представляли собой микродупликации в регионах Xq28 и микроделеции в регионах Xp11.23 и Xq24. В регионах этих микроструктурных перестроек локализованы гены, которые отвечают за пролиферацию и жизнеспособность клетки. Уменьшенная или повышенная доза этих генов может привести к сдвигу инактивации X-хромосомы у матери и гибели ее эмбрионов либо мужского пола, либо женского пола, у которых X-хромосома с CNV остается активной. Анализ обогащения функциональных групп генов неожиданно показал, что в регионах CNV локализованы гены, мутации в которых приводят к X-сцепленным формам умственной отсталости. Очевидно, это указывает на плеiotропные эффекты хромосомных вариантов. Для исключения возможного носительства выявленных CNV у здоровых индивидов проведен поиск микроделеции в регионе Xq24 в расширенной выборке женщин без проблем с репродукцией с помощью ПЦР в реальном времени, а также проведен анализ всех найденных в настоящем исследовании CNV в популяционной выборке (450 человек после анализа генома на высокоплотных чипах). По результатам проверки среди здоровых индивидов не было найдено ни одного случая носительства указанных выше CNV.

Априори считается, что смещение X-инактивации у здоровых носительниц патогенетически значимых CNV происходит за счет избирательной инактивации мутантной X-хромосомы. Однако прямых доказательств этому феномену нет. В настоящем исследовании впервые проведен анализ статуса метилирования региона Xq24 в двух семьях с микроделецией обозначенного региона и у здоровых индивидов с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Результаты проведенного эксперимента показали, что у женщин-носительниц с sXCI средний индекс метилирования 37 CpG-сайтов равен 0,1%, что свидетельствует в пользу неметилированного состояния X-хромосомы без микроделеции и соответственно подтверждает патогенность найденной перестройки.

По результатам работы предложен алгоритм диагностики микроструктурных перестроек у женщин с невынашиванием беременности, который позволяет сузить круг женщин, нуждающихся в молекулярно-цитогенетической диагностике, и предложить им пренатальное, либо преимплантационное генетическое тестирование для рождения здорового ребенка.

ВЫВОДЫ

1. Среди женщин с невынашиванием беременности частота асимметричной инактивации X-хромосомы (6,7%) статистически значимо выше, чем у женщин без проблем с репродукцией (2,2%, $p=0,019$). Не обнаружено статистически значимых различий по частоте асимметричной инактивации X-хромосомы в группах женщин с привычным невынашиванием и спорадическим случаем потери беременности в анамнезе ($p=0,26$).
2. Частота асимметричной инактивации X-хромосомы в группе спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX составила 7,4%, тогда как в группе контроля не было выявлено ни одного случая асимметричной инактивации ($p=0,04$).
3. В выборке женщин с асимметричной X-инактивацией не выявлено патогенных вариантов в генах *XIST* и *XACT*, которые могут привести к нарушению механизма инактивации X-хромосомы.
4. У 30% женщин с невынашиванием беременности и с асимметричной инактивацией X-хромосомы выявлены микродупликации и микроделеции на X-хромосоме. В составе CNV локализованы гены, мутации в которых связаны с пролиферацией и жизнеспособностью клеток, а также гены, мутации в которых вызывают развитие X-сцепленной формы умственной отсталости.
5. У женщин-носительниц микроделеции Xq24 с асимметричной инактивацией X-хромосомы средний индекс метилирования по 37 CpG-сайтов внутри региона делеции составил 0,1%, что свидетельствует в пользу неметилированного состояния X-хромосомы без делеции.
6. Разработан алгоритм диагностики патогенетически значимых CNV на X-хромосоме у женщин с невынашиванием беременности и асимметричной инактивацией X-хромосомы, обеспечивающий профилактику хромосомной патологии с использованием пренатального или преимплантационного генетического тестирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Fonova E.A.**, Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Lopatkina M.E., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A., Aleksandrova T.N., Yuriev S Yu., Skryabin N.A., Stepanov V.A., Lebedev I.N. Skewed X-chromosome inactivation as a possible marker of X-linked CNV in women with pregnancy loss // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2022. – V. 162. – № 3. – P. 97-108.
2. Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Minaycheva L.I., Skryabin N.A., Lopatkina M.E., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Belyaeva E.O., **Fonova E.A.**, Salyukova O.A., Tarabykin V.S., Lebedev I.N. Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from UBE2A deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2020. – V. 160. – № 5. – P. 245-254.
3. Толмачева Е.Н., **Фонова Е.А.**, Лебедев И.Н. X-сцепленные CNV в патогенетике интеллектуальных расстройств // *Генетика*. – 2022. – Т. 58. – №. 10. – С. 1138-1154.
4. Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Назаренко Л.П., Скрыбин Н.А., **Фонова Е.А.**, Беляева Е.О., Салюкова О.А., Минайчева Л.И., Павлова К.А., Затула Л.А., Лебедев И.Н. Эпигенетическая модификация X-сцепленных CNV в норме и патологии // *Медицинская генетика*. – 2018. – Т. 17. – № 11. – С. 29-33.
5. Толмачева Е.Н., Саженова Е.А., Никитина Т.В., **Фонова Е.А.**, Лопаткина М.Е., Затула Л.А., Лебедев И.Н. Эпигенетические модификации X-хромосомы в семьях с невынашиванием беременности // *Медицинская генетика*. – 2020. – Т. 19. – № 11. – С. 81-82.
6. **Фонова Е.А.**, Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Павлова К.А., Лебедев И.Н. X-сцепленные CNV и асимметричная инактивация X-хромосомы // *Медицинская генетика*. – 2020. – Т. 19. – № 3. – С. 19-21.

Статьи в сборниках и материалах конференций:

7. Толмачева Е.Н., Скрыбин Н.А., Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Затула Л.А., **Фонова Е.А.**, Лебедев И.Н. CNV и асимметричная инактивация X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности // *Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики: сборник научных трудов / под. ред. В.А. Степанова. Вып. 12. Томск: Литературное бюро, 2019. – С. 64-65.*
8. **Фонова Е.А.**, Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Назаренко Л.П., Минайчева Л.И., Скрыбин Н.А., Лопаткина М.Е., Бабай Т.С., Затула Л.А., Лебедев И.Н. Инактивация X-хромосомы при нарушении репродукции у человека // *Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. Вып. 29. – Новосибирск: Академиздат, 2019. – С. 22-31.*

Тезисы:

9. Lebedev I., Soloveva E., Zhigalina D., Minaycheva L., Kanbekova O., Nemtsova A., Tolmacheva E., **Fonova E.**, Skryabin N., Kashevarova A., Lopatkina M., Stepanov I.,

- Nazarenko L., Svetlakov A. First report about preimplantation genetic testing for the Xq24 microdeletion related to X-linked mental retardation, Nascimento type in a woman with recurrent pregnancy loss // *Human Reproduction*. – 2020. – V. 35 (Suppl). – P. 78-79.
10. Lebedev I.N., Tolmacheva E.N., **Fonova E.A.**, Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Lopatkina M.E., Belyaeva E.O., Minaycheva L.I., Nazarenko L.P. Shifting to skewed X chromosome inactivation pattern reduces the penetrance of X linked intellectual disability associated CNV in women with a history of pregnancy loss // *Molecular Cytogenetics*. – 2019. – V. 12 (Suppl. 1):1. – P. 23.
 11. Толмачева Е.Н., **Фонова Е.А.**, Соловьёва Е.В., Минайчева Л.И., Лопаткина М.Е., Жигалина Д.И., Кашеварова А.А., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Затула Л.А., Павлова К.А., Лебедев И.Н. Асимметричная инактивация X-хромосомы – перспективный биомаркер X-сцепленных CNV при невынашивании беременности и интеллектуальных расстройствах // *Мультидисциплинарные аспекты молекулярной медицины: сборник материалов V Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное»*. Санкт-Петербург. 26–29 марта 2020 г. – СПб.: Изд-во СПбГЭУ, 2020. – С. 190.
 12. Толмачева Е.Н., **Фонова Е.А.**, Скрыбин Н.А., Кашеварова А.А., Павлова К.А., Затула Л.А., Лебедев И.Н. Аномалии инактивации X-хромосомы при нарушениях эмбрионального развития человека // *Сборник тезисов Международного Конгресса «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (18-22 июня 2019 г., Санкт-Петербург, Россия)*. – С. 823.
 13. **Фонова Е.А.**, Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Затула Л.А., Павлова К.А., Лебедев И.Н. Микроструктурные перестройки X-хромосомы, связанные с модификацией инактивации X-хромосомы // *Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 19–20 ноября 2020 г. [Электронный ресурс] / под ред. В.А. Степанова, Е.Л. Чойнзонова, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.В. Жданова; Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2020. – С. 77-80.*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- aCGH – (от англ. Array Comparative Genomic Hybridization) – сравнительная геномная гибридизация на микрочипах
- CNV – (от англ. Copy Number Variation) – вариации числа копий участков ДНК
- FISH – (от англ. Fluorescence *In Situ* Hybridization) – флуоресцентная *in situ* гибридизация
- MLPA – (от англ. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) – мультиплексная лигазная реакция
- NGS – (от англ. Next Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения
- PBS – (от англ. Phosphate-Buffered Saline) – натрий-фосфатный буфер
- qPCR – (от англ. quantitative Polymerase Chain Reaction) – количественная полимеразная цепная реакция
- SNP – (от англ. Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм
- sXCI – (от англ. skewed X-chromosome inactivation) – асимметричная инактивация X-хромосомы
- XCI – (от англ. X-chromosome inactivation) – инактивация X-хромосомы
- XLID – (от англ. X-Linked Intellectual Disability) – X-сцепленная умственная отсталость
- ВПР – врожденные пороки развития
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗПР – задержка психического развития
- м.п.н. – миллион пар нуклеотидов
- НБ – невынашивание беременности
- ПНБ – привычное невынашивание беременности
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- УО – умственная отсталость
- ЦНС – центральная нервная система

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03

д-р мед. наук Назаренко М.С.

e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru