

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

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор РАН
Лебедев Игорь Николаевич

Томск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Инактивация X-хромосомы как эпигенетическое явление	15
1.2 Микроструктурные перестройки и инактивация X-хромосомы.....	22
1.2.1 Вариации числа копий участков ДНК	22
1.2.2 Инактивация X-хромосомы как критерий патогенности CNV	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Дизайн исследования.....	40
2.2 Характеристика исследуемых групп.....	41
2.3. Молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования	43
2.3.1. Выделение ДНК фенол-хлороформным методом	43
2.3.2. ПЦР-анализ наличия гена <i>SRY</i>	45
2.3.3. Мультиплексный ПЦР-анализ 26-ти полиморфных локусов геномной ДНК.....	45
2.3.4. Метил-чувствительная ПЦР высокополиморфного экзона I гена рецептора андрогена (<i>AR</i>) и фрагментный анализ.....	46
2.3.5. Матричная сравнительная геномная гибридизация (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)	49
2.3.6. Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (quantitative Real-Time PCR, qPCR)	55
2.3.7. Мультиплексная лигазная реакция (multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA).....	58
2.3.8. Таргетное секвенирование генов <i>XIST</i> и <i>XACT</i>	59
2.3.9. Анализ метилирования в регионах делеции с помощью массового параллельного секвенирования и бисульфитной модификации.....	61
2.3.10. Использованные электронные ресурсы и базы данных.....	63
2.3.11. Биоинформационные ресурсы и статистический анализ данных.....	64

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
3.1. Анализ характера инактивации X-хромосомы	66
3.1.1 Анализ характера инактивации X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности.....	66
3.1.2 Исследование статуса инактивации X-хромосомы у спонтанных абортусов.....	69
3.2. Идентификация патогенных вариантов в генах <i>XIST</i> и <i>XACT</i> с использованием целевого секвенирования нового поколения	71
3.3. Поиск вариаций числа копий ДНК у женщин и спонтанных абортусов с <i>sXCI</i>	74
3.4. Анализ патогенетически значимых CNV в контрольной выборке женщин без проблем с репродукцией.....	80
3.5. Сегрегационный анализ X-сцепленных CNV	81
3.5.1 Дупликации в регионе Xq28	81
3.5.2. Делеции на X-хромосоме	87
3.6 Определение статуса инактивации X-хромосомы с несбалансированными хромосомными мутациями у женщин-носительниц и у спонтанных абортусов.....	99
3.7 Алгоритм диагностики X-сцепленных CNV у женщин с невынашиванием беременности.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Инактивация X-хромосомы (от англ. XCI – X chromosome inactivation) – процесс, во время которого одна из двух X-хромосом женского эмбриона 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 (50% клеток содержат активную X-хромосому от матери, а 50% клеток содержат активную X-хромосому от отца). Но в некоторых случаях встречается и избирательная (асимметричная) инактивация, когда преимущественно инактивируется X-хромосома одного из родителей. В работе Amos-Landgraf J.M. с соавторами было показано на простой биномиальной модели, что асимметричная инактивация X-хромосомы (sXCI - skewed X chromosome inactivation, более 90%) является крайне маловероятным событием, которое может встречаться в популяции в пределах 1,8-3,6 %. Вероятность появления sXCI в семьях с X-сцепленной патологией и появления sXCI в семьях без X-сцепленной мутации авторами выведено как апостериорное отношение шансов ~100:1 [Amos-Landgraf J.M. et al., 2006]. В редких случаях семейной асимметричной X-инактивации встречаются варианты в *XIST* или других генах, которые влияют на сам процесс инактивации [Plenge R.M. et al., 1997]. Вторым источником sXCI - это начальная инактивация, которая происходит обычно в небольшом пуле клеток, например, при разделении зиготы и образовании близнецов [Redonnet-Vernhet I. et al., 1996; Bamforth F. et al. 1996; Goodship J. et al. 1996] и у плодов с ограниченным плацентарным мозаицизмом и коррекцией трисомии [Lau A.W. et al., 1997]. Считается, что sXCI чаще всего является результатом отбора в популяции клеток, инактивация которых изначально была случайной [Migeon B.R., 1998], а степень отбора варьирует в зависимости от типа ткани [Gale R.E. et al., 1994; Sharp A. et al., 2000].

Одной из причин формирования sXCI могут быть как крупные, так и мелкие структурные хромосомные варианты – CNV (Copy Number Variation), которые могут привести к клиническим последствиям для здоровья или репродуктивных способностей женщины. В работе 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 небольшая делеция в Xq28 была связана как с sXCI, так и с повторяющимися выкидышами [Pergeraro E. et al., 1997]. Для адекватной интерпретации биологической значимости вариаций числа копий участков ДНК необходимо установить локализацию, генный состав и статус наследования CNV, поэтому исследования субмикроскопических хромосомных вариаций необходимо проводить не только в клетках эмбрионов, но и у их родителей.

Асимметричная инактивация X-хромосомы у женщины также связана с привычным невынашиванием беременности [Su Y. et al., 2015]. Наличие у женщины X-сцепленной микроперестройки, влияющей на жизнеспособность эмбриона, может в некоторых случаях привести к рождению потомка с той же X-сцепленной перестройкой. Но перед этим у нее может произойти несколько самопроизвольных выкидышей. Всё это время причина невынашивания беременности будет неустановлена, 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 позволит 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 в этом случае позволит с использованием вспомогательных репродуктивных технологий родить здорового ребенка.

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 [Tchieu J. et al., 2010; Nichols J., Smith A., 2009; Mekhoubad S. et al., 2012; Nazor K. L. et al., 2012; Patel S. et al., 2017; Vallot C. et al., 2015; Богомазова А.Н. и др., 2015; Petropoulos S. et al., 2016; Пристяжнюк И.Е., Мензоров А.Г., 2017; Панова А.В. и др., 2020]. Однако для человека некоторые методы неприменимы в виду межвидовых различий (животные модели) или по причине такого явления как эрозия неактивной X-хромосомы из-за длительного культивирования. Чаще всего изучение статуса инактивации X-хромосомы у человека происходит на организменном уровне при определенных патологиях, то есть ретроспективно – когда необходимо установить причину патологического фенотипа или его отсутствия.

Несмотря на тот факт, что изучение явления 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 высокой внутриутробной летальности эмбрионов с X-сцепленной мутацией и рождение детей с наличием X-сцепленной патологии у мужских потомков и у женских потомков 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.T с соавторами, на 2011 год было опубликовано только 12 исследований, в которых изучали связь инактивации X-хромосомы с привычным невынашиванием беременности 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 многочисленные исследования показывают необходимость генетического тестирования как семейных пар с невынашиванием, так и их абортного материала с целью персонализированного подхода к профилактике наследственных заболеваний [Rajcan-Separovic E. et al., 2010; Wen J. et al., 2015; Bagheri H. et al., 2015; Finley J. et al., 2022; Byrne et al., 2023]. При этом нет работ, изучающих проблему невынашивания беременности, где выявленные X-сцепленные варианты 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 микроделеций 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 микроделециями 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. 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 микроделеции в регионах Xp11.23 и Xq24. В этих регионах 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 делеции 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 преконцепционной и пренатальной диагностики, что позволит обеспечить качественное медико-генетическое консультирование семей

Теоретическая и практическая значимость работы

Научная значимость результатов исследования заключается в получении новых фундаментальных знаний о механизмах реализации эффектов асимметричной инактивации X-хромосомы и фенотипических проявлениях несбалансированных хромосомных вариантах при нарушении репродукции у человека.

Выявлен спектр патогенных CNV на X-хромосоме у женщин с sXCI, которые могут привести к невынашиванию беременности. Экспериментально доказана преимущественная инактивация X-хромосомы с делецией региона

Xq24 у женщин-носительниц с помощью определения статуса метилирования в регионе патогенного варианта, что объясняет бессимптомное носительство и отсутствие клинических проявлений.

По результатам исследования разработан алгоритм диагностики X-сцепленных CNV у женщин с невынашиваем беременностями. Протокол был применен в двух случаях диагностики делеции в регионе Xq24. В первом случае были проведены две пренатальные диагностики у женщины-носительницы делеции. По результатам пренатальной диагностики в двух беременностях было исключено носительство делеции у плодов женского пола. Во втором случае для женщины-носительницы была разработана схема преимплантационного генетического тестирования и из восьми бластоцист была выбрана одна без хромосомной перестройки. К сожалению, беременность не наступила, по причине низкой рецептивности эндометрия. Таким образом, полученные данные об асимметричной инактивации X-хромосомы и возможных микроструктурных перестройках на X-хромосоме у женщин с невынашиванием беременностей могут быть использованы в диагностической практике с целью скринингового исследования семей с невынашиванием беременности или наличием X-сцепленных вариантов. Кроме того, результаты работы могут быть востребованы в рамках образовательного процесса при подготовке студентов, клинических ординаторов, аспирантов медицинских вузов и слушателей курсов повышения квалификации по специальности «генетика».

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. Так, 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 был проведён поиск микроструктурных вариаций копийности ДНК. Высокая разрешающая способность использованной технологии позволила обнаружить субмикроскопические хромосомные aberrации, не выявленные при стандартном кариотипировании. Инструментом для интерпретации результатов, полученных с помощью микрочипового метода, и определения клинической значимости идентифицированных CNV явилась работа с базами данных DGV, OMIM, DECIPHER.

С целью подтверждения обнаруженных вариаций числа копий у пациентов и установления их происхождения был использован метод ПЦР в режиме реального времени с подбором праймеров для исследуемых локусов. Для больных, имеющих верифицированные патогенные и вероятно патогенные микродупликации, проведён детальный анализ клинических признаков с привлечением литературных данных.

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

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 инаktivация 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 инаktivацией 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 инаktivации мутантной X-хромосомы.

Степень достоверности полученных результатов

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 научно-квалификационной работы

Результаты научно-исследовательской работы 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 2020г., 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

Основные результаты по теме диссертации изложены в 13 публикациях, 6 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук: 2 - в зарубежном журнале «Cytogenetic and Genome Research», 1 статья в журнале «Генетика». Оба журнала входят в базы Web of Science и Scopus. 3 статьи опубликовано в журнале «Медицинская генетика», 2 статьи в сборниках трудов научных конференций и 5 тезисов докладов в материалах отечественных и международных конференций

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в изучении отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, участии во всех этапах её выполнения (планировании, проведении молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, клиническом обследовании пациентов и членов их семей, анализе и обобщении полученных данных,

обсуждении результатов и их публикации), в написании и оформлении диссертационной работы.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами, 22 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с изложением результатов собственных исследований с 5 подглавами, заключения, выводов, приложения. Библиографический указатель включает 177 источников литературы, из них 18 – отечественных и 159 – иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Инактивация X-хромосомы как эпигенетическое явление

Инактивация X-хромосомы (XCI, X chromosome inactivation) — явление, которое происходит как механизм дозовой компенсации, заключающийся в случайной инактивации одной из двух X-хромосом у женщин (материнской или отцовской) [Lyon M.F., 1962]. Инактивация X-хромосомы происходит в раннем эмбриогенезе и в норме имеет равновероятный характер, то есть 50% соматических клеток содержат инактивированную отцовскую X-хромосому и 50% клеток содержат инактивированную материнскую X-хромосому.

Асимметричная инактивация X-хромосомы или смещение инактивации X-хромосомы (skewed X-chromosome inactivation, sXCI) определяется при смещении показателя инактивации одной из родительских X-хромосом в 75–80% клеток. В случае же смещения инактивации в 90–95% клеток это состояние называется экстремальным смещением инактивации X-хромосомы [Busque L. et al., 2009; Minks J. et al., 2008].

Важную роль в процессе инактивации X-хромосомы играет центр инактивации (XIC), который локализован в регионе Xq12. Центральное место в этом процессе занимает ген *XIST*, который кодирует протяженную нетранслируемую РНК, размером 17 тыс. нуклеотидов. РНК гена *XIST* не покидает ядро. Она распространяется по выбранной для инактивации X-хромосоме и начинает подавлять транскрипцию гена. Кроме того, РНК *XIST* может связываться с белковыми комплексами, вызывающими образование неактивного гетерохроматина инактивированной X-хромосомы. Другая видоспецифичная длинная некодирующая РНК, *ХАСТ*, была обнаружена в плюрипотентных клетках человека. Она находится на активной X-хромосоме, возможно, предотвращает сплайсинг до завершения процесса инактивации [Vallot C. et al., 2013; Vallot C. et al., 2015].

Процесс XCI можно разделить на три этапа: инициирование, распространение и поддержание. Центральный сайт инициации XCI

занимают следующие гены: *XIST*, кодирующий нетранслируемую РНК, *TSIX*, с которого считываются антисмысловые транскрипты, связанные с предыдущим геном кодирования и деактивации, и *Xes*, модификатор выбора той хромосомы, которая будет подвергнута инактивации [Courtier B. et al. 1995].

Одновременная экспрессия генов *XIST* и *TSIX* на каждой X-хромосоме обнаружена на стадии четырех бластомеров, когда клетки еще тотипотентны. Во время транскрипции *TSIX* транскрипция *XIST* блокируется. Образуется нестабильный комплекс смысловой и антисмысловой РНК обоих генов. Но затем в одной из X-хромосом под влиянием неизвестного в настоящее время аутосомного транс-фактора происходит репрессия гена *TSIX*, что приводит к повышению уровня экспрессии *XIST*-РНК, которая распространяется в обе стороны по всей хромосоме и обеспечивает ее инактивацию. К *XIST*-РНК присоединяются различные белки, что приводит к локальному изменению структуры хроматина, делая его более доступным для вторичной модификации в результате метилирования ДНК [Chao W. et al., 2002]. Ген *TSIX* не репрессирован на другой X-хромосоме, а его антисмысловая РНК связывается с РНК *XIST* и блокирует ее накопление. Эта X-хромосома остается активной. Важно отметить, что РНК гена *XIST* имеет цис-эффект, то есть локализуется исключительно в рамках «своей» X-хромосомы [Courtier B. et al. 1995; Peeters S.B. et al., 2016].

Факультативный гетерохроматин инактивированной X-хромосомы (Xi) можно разделить на два типа, чередующиеся и не перекрывающиеся между собой [Chadwick B.P., Willard H.F., 2004]. Первый тип имеет зависимость от экспрессии РНК гена *XIST* и ассоциирован с присутствием триметилированного гистона H3 по лизину K27 (H3K27me3), гистона макро H2A1.2 и убиквитинированного гистона H2A по лизину K119. Второй тип факультативного гетерохроматина инактивированной X-хромосомы представлен триметилированным гистонам H3 по лизину K9 (H3K9me3),

гетерохроматин специфичным белком HP1 и триметилированным гистоном H4 по лизину K20 (H3K20me3) [Шевченко А.И., 2016].

Известно, что процесс инактивации X-хромосомы не импринтируется в плаценте человека [Moreira de Mello J.S. et al., 2010], которая является органом, происходящим из трофэктодермы. Инактивация X-хромосомы у человека не происходит до имплантации или, по крайней мере, поздней стадии бластоцисты [Deng X. et al., 2014]. Так, исследование *in vitro* эмбрионов человека до имплантации с помощью РНК-FISH (гены *ATRX*, *FGD1*, *HUWE1* и *XIST*) показало биаллельную экспрессию в большинстве бластомеров у эмбрионов женского пола [Okamoto I. et al., 2011]. Окрашивание преимплантационных эмбрионов женского пола показало, что облака *XIST* (lncRNA) начинают формироваться на стадии восьми клеток [van den Berg I.M. et al., 2009].

Исследование статуса XCI в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека также внесло вклад в понимание процесса инактивации X-хромосомы. Ранее показано, что многие линии ЭСК человека лишены покрытия *XIST* на неактивной X-хромосоме (Xi) в недифференцированном состоянии и поэтому не реактивируют экспрессию гена *XIST* при дифференцировке [Hall L.L. et al., 2008; Shen Y. et al., 2008; Silva S.S. et al., 2008]. В исследовании 2010 года сообщалось, что в линиях ЭСК человека, культивированных в среде с 5 % содержанием кислорода, инактивация еще не наступает, тогда при повышении кислорода до уровня атмосферных значений (25%) наступает активация *XIST* и появляется неактивная X-хромосома [Lengner C.J. et al., 2010].

Помимо эмбриональных стволовых клеток человека, исследования процесса инактивации X-хромосомы проводятся и на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК). Было показано, что и в ЭСК, и в ИПСК экспрессия *XIST* постепенно утрачивается, что сопровождается метилированием промотора *XIST* [Nichols J., Smith A., 2009; Tchieu J. et al., 2010; Mekhoubad S. et al., 2012; Nazor K. L. et al., 2012]. Потеря *XIST* в этих

плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) обычно сопровождается частичной реактивацией X_i , когда репрессия транскрипции некоторых, но не всех генов на X_i исчезает, что приводит к разрушению общего неактивного состояния X_i – явлению, названному эрозией X_i . Степень эрозии X_i (т.е. количество генов, затронутых этим процессом) различается между отдельными линиями клеток; однако утрата *XIST* происходит почти во всех изученных линиях с течением времени в культуре клеток и часто приводит к эрозии X_i [Patel S. et al., 2017]. Таким образом, предполагается защитная роль *XIST* в предотвращении эрозии X_i [Vallot C. et al., 2015].

Исследования 2016 года показали, что lncRNA *XACT* экспрессируется с активных X-хромосом (X_a) и ее экспрессия наблюдается в преимплантационных эмбрионах человека как у мужчин, так и у женщин [Petrooulos S. et al., 2016]. Более того, показано, что делеция *XACT* приводит к усилению экспрессии генов, связанных с нейронами и влияет на дифференцировку моторных нейронов как в мужских, так и в женских линиях клеток. Нарушение регуляции генов и влияние на дифференцировку двигательных нейронов также наблюдались при репрессии РНК *XACT* системой ингибирования CRISPR, что указывает на то, что РНК *XACT* участвует в регуляции генов, влияющих на дифференцировку нейронов. Авторами отмечено, что *XACT* необязателен для поддержания эрозии репрессии генов X-линии на неактивных X-хромосомах, но влияет на регуляцию генов, связанных с развитием [Motosugi N. et al., 2021].

Одной из причин смещения инактивации X-хромосомы могут быть мутации в гене *XIST*. В 2016 году, по данным исследования причин sXCI в некоторых семьях были выявлены мутации в гене *XIST* [Viggiano E. et al., 2016]. Также, у так называемых эмбрионов низкого качества (poor-quality embryos) женского пола, полученных в результате процедуры ЭКО, с асимметричной X-инактивацией была обнаружена потеря гетерозиготности (LOH) на протяженных участках X-хромосомы, захватывающих либо ген *XIST*, либо *XACT* [Luo Y. et al., 2014].

Состояние инактивированной X-хромосомы является стабильным и клонально передается во многих поколениях клеток. Целый ряд генов, которые локализованы на инактивированной X-хромосоме, также подвергаются инаktivации, но имеется доля генов, избегающих инаktivации.

Так, при изучении экспрессии генов X-хромосомы было показано, что 12% генов избегают инаktivации и еще 10% генов имеют полиморфный характер экспрессии, т.е. подвергаются инаktivации у одних женщин и избегают инаktivации у других [Carrel L., Willard H.F., 2005; Balaton B.P. et al., 2015]. В том случае, когда гены X-хромосомы имеют гомологи на Y-хромосоме в псевдоаутосомных регионах, избегание инаktivации позволяет контролировать равный уровень экспрессии генов между полами. Однако многие избегающие инаktivации гены не имеют Y-гомологов [Аноприенко, Закиян, 2004]. Возможно, что более высокий уровень экспрессии этих генов у женщин либо отвечает за формирование специфичных для женского пола признаков, либо не имеет существенной роли [Disteche C.M., 1995; Brown C.J., Greally J.M., 2003]. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что уровень экспрессии большинства избегающих инаktivации генов человека на неактивной X-хромосоме не превышает 10 % от уровня экспрессии на активной X-хромосоме [Carrel L., Willard H.F., 2005; Nguyen D.K., Disteche C.M., 2006; Johnston C.M. et al., 2008]. Не исключено также, что разница в уровне экспрессии генов X-хромосомы между полами может устраняться на посттранскрипционных стадиях [Disteche C.M., 1995; Brown C.J., Greally J.M., 2003]. Кроме того, те гены неактивной X-хромосомы, которые избегают инаktivации, остаются не метилированы [Bird A., 2002; Delcuve G.P. et al., 2009].

Смещение инаktivации X-хромосомы может иметь стохастический характер и возникать из-за компартментализации бластомеров при раннем развитии. На стадии 8-клеточной морулы происходит активация эмбрионального генома и начинают работать контрольные точки клеточного

цикла, соответственно, часть бластомеров с числовыми хромосомными аномалиями, такими, например, как моносомии, направляются в апоптоз и пул бластомеров уменьшается. Поэтому смещение инактивации может возникнуть случайным образом из-за изменений пропорций клеток с разными кариотипами и разной пролиферативной активностью.

В зависимости от ситуации sXCI может приводить к различным результатам. Если на обеих родительских X-хромосомах нет генных мутаций, то эффект sXCI рассматривается как нейтральный. Но если есть мутации в X-сцепленных генах, то все зависит от того, какой гомолог будет подвергнут преимущественной инактивации X-хромосомы. Если инактивирована X-хромосома без мутации, то активная X-хромосома с мутацией приведет к формированию и проявлению патологических симптомов и как следствие – к патологическому фенотипу. Более того, в качестве примера клинической вариабельности симптомов вследствие X-инактивации можно рассмотреть явление несбалансированных X-аутосомных транслокаций. Инактивация X-хромосомы может распространяться на транслоцированный аутосомный фрагмент, что приведет к менее выраженной клинической картине аутосомного синдрома, как в описанном случае Watanabe T. с соавторами где у пациентки с бесплодием несбалансированная транслокация «X-аутосома» привела к делеции Xq28-qter и трисомии по 8q13-qter [Watanabe T. et al. 2018]. Несмотря на то, что дистальная трисомия 8q является редким заболеванием и включает тяжелую умственную отсталость, нарушение роста, дисморфические черты лица, у этой пациентки не наблюдалось никакой патологии, кроме бесплодия и неспецифических стигм дизэмбриогенеза. Если же смещение происходит в сторону инактивации мутантной X-хромосомы, то оно приведет к протективному эффекту для фенотипа (Рисунок 1).

отсутствие симптомов X-сцепленных заболеваний

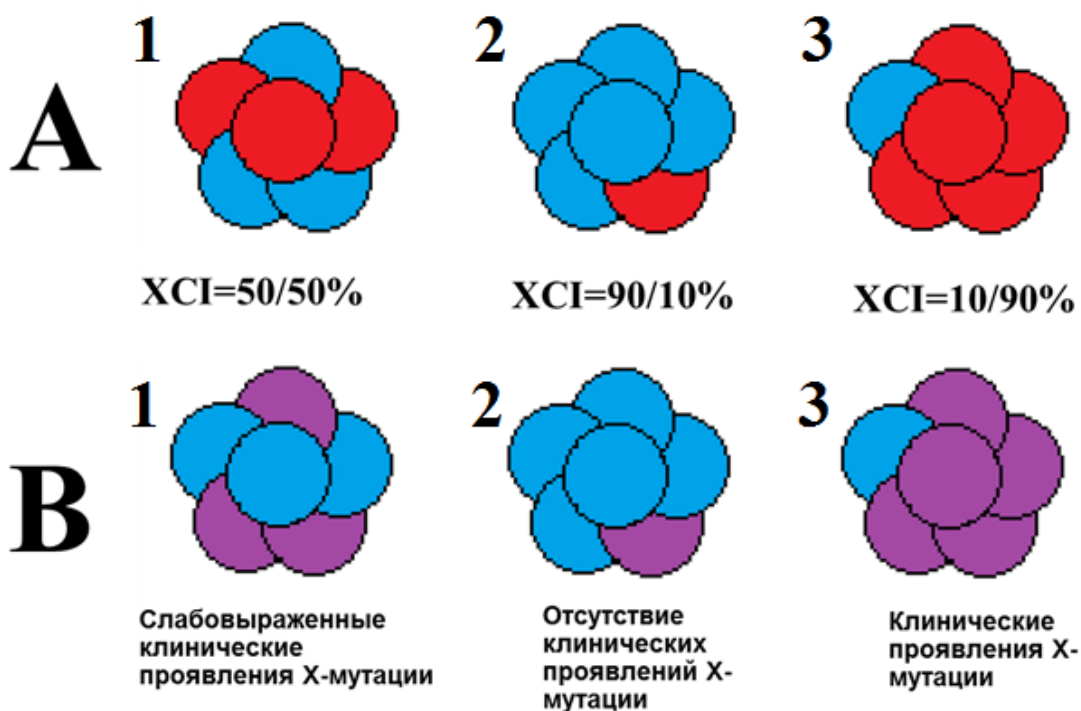


Рисунок 1 - Эпигенетическая регуляция манифестации X-сцепленных мутаций у женщин.

А – нормальный фенотип при отсутствии X-сцепленных мутаций и различных вариантах инактивации X-хромосомы (А-1 – равновероятная XCI, А-2 - смещение инактивации в сторону X-хромосомы от отца; А-2 - смещение инактивации в сторону X-хромосомы от матери);

В – вариации клинических проявлений при наличии X-сцепленной мутации на хромосоме отцовского происхождения в зависимости от вариантов инактивации X-хромосомы (В-1 – равновероятная XCI, В-2 - смещение инактивации в сторону X-хромосомы от отца; В-3 - смещение инактивации в сторону X-хромосомы от матери).

Примечания: красным цветом обозначена клетка с инактивацией X-хромосомы от матери, синим цветом обозначена клетка с инактивацией X-хромосомы от отца, фиолетовым цветом обозначена клетка с X-мутацией и с инактивацией X-хромосомы от матери.

Так в случае PHACE-ассоциации (Posterior fossa brain malformations, Hemangiomas of the face (large or complex), Arterial anomalies, Cardiac anomalies, Eye abnormalities), заболевания с неясной этиологией, предполагающего наличие сочетанных пороков развития, было показано, что

поражённые индивиды имеют равновероятную XCI, а их здоровые матери – асимметричную [Levin J.H., Kaler S.G., 2007]. Вероятнее всего то, что наличие мутаций в X-сцепленном гене у матерей маскируется смещением XCI, тогда как у их дочерей мутантный фенотип проявляется. Еще одним примером корректирующего влияния sXCI на фенотип является синдром Ретта – X-сцепленное доминантное заболевание. Анализ нескольких семейных случаев болезни Ретта показал, что у матерей и у 6 из 8 больных в этих семьях выявляется асимметричная XCI [Knudsen G.P.S. et al., 2006].

Более явный результат будет наблюдаться, когда смещение произошло из-за инактивации X-хромосомы «дикого» типа, тогда как мутантная хромосома остается активной. Асимметричная инактивация X часто является причиной фенотипического проявления X-сцепленных заболеваний у женщин-носительниц, например, при миодистрофии Дюшенна [Viggiano E. et al., 2016, Лялина А.А. и др., 2021] или гемофилии [Сурин В. Л. и др., 2018]. Смещение инактивации (степень смещения $XCI > 90\%$) обнаружено и у женщин с болезнью Альцгеймера [Bajic V. et al., 2016]. В исследовании Di-Battista A. с соавторами выявили, что в случаях дупликации региона Xp11.23-p11.22, проявляющимися серьезными фенотипическими нарушениями, у больных наблюдается асимметрия XCI [Di-Battista A. et al., 2016]. Авторы предположили, что увеличение дозы некоторых протоонкогенов, локализованных в регионе дупликации, дает селективное преимущество именно тому пулу клеток, которые содержат активную X-хромосому с дупликацией.

1.2 Микроструктурные перестройки и инактивация X-хромосомы

1.2.1 Вариации числа копий участков ДНК

Вариации числа копий участков ДНК представляют собой сегменты ДНК размером от 1 кб до нескольких Мб, число копий которых различается в индивидуальных геномах [Vissers L.E.L.M. et al., 2016].

Размер выявляемых CNV значительно уменьшился с развитием технологий высокого разрешения, таких как сравнительная геномная гибридизация с использованием микрочипов (array Comparative Genomic Hybridization - aCGH) и массовое параллельное секвенирование (Massively Parallel Sequencing - MPS). CNV могут затрагивать несколько генов, т.е. быть протяженными, но и могут включать только отдельные экзоны и/или интроны, т.е. быть моногенными. Минимальный уровень CNV в настоящее время принимается равным 50 п.н. [Capalbo A. et al., 2017].

Было показано, что генные делеции встречаются значительно реже, чем делеции межгенных участков, тогда как среди дупликаций такой разницы не отмечено [Sudmant P.H. et al., 2015]. Кроме того, продемонстрирована обратная корреляция частоты делеции с её размером [Sudmant P.H. et al., 2015; Zarrei M. et al., 2015].

В большинстве случаев CNV стабильны и могут наследоваться. Кроме того, они могут возникать *de novo* в процессе мейоза, однако молекулярные механизмы образования вариаций числа повторов пока недостаточно изучены. В Базе данных Геномных Вариантов (DGV) уже описано более 66 741 CNV, обнаруженных у здоровых индивидов (<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg19>). В зависимости от метода определения вариаций числа повторов (что зависит от плотности маркеров на использованной для исследования микрочиповой платформе), они составляют до 12% от всего генома человека [Redon R. et al., 2006]. Более 41% CNV перекрываются с известными генами и, следовательно, способны влиять на регуляцию генной экспрессии через эффект дозы или положения.

Но все еще вызывают трудности интерпретации клинической значимости CNV, поскольку существуют как нейтральные вариации числа копий ДНК, так и патогенетически значимые перестройки, приводящие к формированию патологического фенотипа. Так, при анализе данных матричной сравнительной геномной гибридизации с целью идентификации вариаций, ассоциированных с какой-либо патологией, выделяют три

основных группы вариантов: патогенные, доброкачественные и варианты неизвестного значения [Kearney H.M. et al., 2011; Шилова Н.В., Миньженкова М.Е., 2018]. Согласно базам данных полиморфных и патогенных CNV (DGV и DECIPHER), в геноме человека идентифицировано около 7 млн CNV, из которых только около 0,5% являются патогенными [Твеленёва А.А., Шилова Н.В., 2019]. Такой низкий процент патогенных вариантов можно теоретически объяснить сложностью доказательства патогенетической значимости: поиск и идентификация микроструктурных перестроек у пациентов со сходной клинической картиной может занимать достаточно продолжительное время по причине редкости подобных мутаций. Принято считать, что на потенциальную патогенетическую значимость CNV оказывают влияние происхождение вариации (наследование её от родителей-носителей или возникновение *de novo*), отсутствие или наличие данной вариации у здоровых индивидов, тип CNV (микроделеция или микродупликация), размер, и генный состав. Фенотипические проявления эффектов CNV могут варьировать от неспецифической симптоматики до ранней внутриутробной гибели плода [Hurles M.E. et al., 2008]. Структурная вариабельность некоторых районов генома не сопровождается патологическими изменениями фенотипа, в то время как геномный дисбаланс, обусловленный наличием CNV, в других регионах является клинически значимым [Girirajan S. et al., 2011]. Так, у 5–15% пациентов с умственной отсталостью выявляются субмикроскопические CNV [Koolen D.A. et al., 2009; Miller D.T. et al., 2010].

Для интерпретации значимости крайне необходим сегрегационный анализ: если выявленная вариация числа копий участка ДНК регистрируется как у пациента (абортуса), так и у его здорового родителя, то, за отсутствием модифицирующих факторов, выдвигается предположение о фенотипически нейтральном эффекте CNV, а если CNV возникает *de novo*, то вполне возможна связь этой CNV с формированием патологического фенотипа. Однако следует заметить, что даже унаследованная CNV может оказаться

клинически значимой, например, в том случае, если она затрагивает импринтированные гены. В данной ситуации функциональная значимость CNV будет зависеть от того, на каком гомологе она локализована – на метилированном и неактивном или на неметилированном и активном. Одним из таких примеров CNV можно назвать делецию в регионе 15q11-q13. Еще в 1981 г. Ledbetter D. H. с соавторами впервые описали интерстициальную делецию в проксимальной части длинного плеча хромосомы 15 как генетическую причину синдрома Прадера-Вилли [Ledbetter D. H. et al., 1981]. Синдром Прадера-Вилли (СПВ) представляет собой мультисистемное сложное генетическое заболевание, связанное с отсутствием функциональной отцовской копии хромосомы 15q11-q13. Существует три основных молекулярных механизма формирования СПВ: наиболее частым является хромосомная делеция (до 65–75%), затем материнская однородительская дисомия (20–30%), дефекты центра импринтинга (1–3%) и редкие хромосомные транслокации (2%) [Yamazawa K. Et al., 2010; Irizarry K. A. et al., 2016; Napolitano L. et al., 2021]. Однако, если происходит потеря материнской копии хромосомы 15q11-q13, то развивается заболевание с совершенно другой клинической картиной – синдром Ангельмана. Кроме того, в случае гетерозиготной вариации числа копий участков ДНК, потенциально могут проявиться рецессивные мутации на другом гомологе, а гомозиготные CNV у потомков проявляются тяжелее, чем гетерозиготные у родителей.

Комплексная оценка патогенности выявленных CNV позволяет с наибольшей точностью классифицировать выявленные варианты. Достаточно большое количество факторов, которые необходимо учитывать при оценке патогенности микроструктурных перестроек привело к идее компьютеризации и созданию «генетических калькуляторов». Так, в 2021 году Zhang L. с соавторами предложили программу для прогнозирования патогенности CNV (www.unimd.org/XCNV) [Zhang L. et al., 2021]. Программа «X-CNV» включает в себя четыре основных компонента: сбор и

нормализация данных CNV, построение модели, оценка модели, интерпретация и применение модели. Модель была обучена на основе алгоритма XGBoost с использованием 30 прогностических признаков на 5315 патогенных и 14 260 доброкачественных CNV из dbVar и проверена на 4893 патогенных и 4073 доброкачественных CNV из ClinGen и DECIPHER. Частота аллелей (AF) CNV рассчитывается на основе унифицированных CNV из DGV и dbVar.

Однако в этой программе интерпретация патогенности X-сцепленных CNV фактически происходит с теми же параметрами, как и для аутосомных CNV, что является существенным недостатком для определения патогенности дупликаций или делеций.

В 2005 году была расшифрована полная последовательность X-хромосомы и было показано, что из 1098 генов более половины продуцируют белки, необходимые для функционирования головного мозга [Ross M.T. et al., 2005]. Чуть более позднее исследование показало, что из 867 известных X-сцепленных генов, кодирующих белок, продукты более 500 генов экспрессируются в мозге [Gecz J. et al., 2009]. Считается, что большинство X-сцепленных генов, в которых выявляют мутации, вызывают сходный патогенез формирования патологического фенотипа: эти гены влияют на развитие, миграцию клеток, формирование и поддержание нейронных сетей и межклеточной коммуникации в мозге. Гены, расположенные на X-хромосоме, влияют не только на общий интеллект, но также имеют относительно специфический эффект на социальное познание и эмоциональную регуляцию [Ross M.T. et al., 2005].

Известно, что по сравнению с гемизиготными мужчинами, гетерозиготные женщины-носители патогенной X-сцепленной CNV вследствие наличия второго гомолога X-хромосомы обычно демонстрируют переменную экспрессию фенотипа, что создает большие трудности для их прогностической оценки, основной причиной которой является эффект фенотипической модификации инактивации X-хромосомы.

Для корректной интерпретации клинической значимости X-сцепленных субмикроскопических перестроек следует обращать внимание на особенности их сегрегации по материнской линии. Кроме того, нельзя забывать о необходимости анализа статуса инактивации X-хромосомы у гетерозиготных носительниц X-сцепленной перестройки. Чаще всего у носительниц либо совсем не проявляются, либо проявляются минимальные фенотипические особенности, присущие конкретной хромосомной мутации из-за случайной или асимметричной XCI [Bauters M. et al., 2008]. Но в некоторых случаях именно симптоматические носительницы имеют sXCI [Migeon B. et al., 2020].

В отличие от делеций, адекватная интерпретация клинической значимости дупликаций на X-хромосоме не всегда однозначна. Локализация в области дупликации генов, ассоциированных с X-сцепленной умственной отсталостью (XLID), не всегда означает, что дупликация является патогенетически значимой. К примеру, дупликация, которая рассматривается как вероятно патогенная – это внутригенная дупликация в гене *TSPAN7* (OMIM 300096), локализованном в регионе Xq11.2. Ген *TSPAN7* высоко экспрессируется в головном мозге, и некоторые генные мутации *TSPAN7* могут приводить к формированию X-сцепленной формы интеллектуальной недостаточности (X-сцепленное нарушение интеллектуального развития 58; OMIM 300210). Однако, связь моногенной микродупликации, затрагивающей ген *TSPAN7*, с патогенезом умственной отсталости, до сих пор остается неясной. Ранее Noor A. С соавторами показали, что внутригенная дупликация *TSPAN7* у пациента с аутизмом не приводит к изменению последовательности кДНК и, соответственно, не может быть причиной этого заболевания [Noor A. et al., 2009]. Кроме того, микродупликации этого гена были выявлены у некоторых здоровых индивидов [Cai G. et al., 2008]. Вместе с тем, накопился определенный массив данных в пользу того, что эта дупликация является патогенетически значимой. Были проанализированы клинические фенотипы 29 пациентов базы данных DECIPHER

[<https://www.deciphergenomics.org>], 4 пациентов с такой же дупликацией на X-хромосоме, описанных в литературе ранее [Utine G.E. et al., 2012, Толмачева Е.Н. и др., 2021]. Суммарные нарушения интеллектуальной сферы, включающие умственную отсталость, задержку психического развития, задержку развития речи и расстройства аутистического спектра наблюдались практически у 100% пациентов, мышечная гипотония в 15% случаев. Также были зарегистрированы поражения головного мозга (гетеротопия серого вещества, атрофия мозжечка, энцефалопатии), патология слуха, аномалии кожи, гипермобильность суставов, ожирение. Кроме того, у 20% гемизиготных носителей дупликации встречались такие дисморфические особенности, как: аномальные формы черепа (микроцефалия, брахицефалия, долихоцефалия), приросшая мочка уха, гипертелоризм, недоразвитые крылья носа, короткий сглаженный фильтр, высокое небо, тремы зубов.

В последние годы изучение причин невынашивания беременности также приводит к появлению новых данных о различных микроструктурных вариантах хромосом в патогенезе эмбриолетальности [Zhang Y. X. et al., 2009; Warren J. E. et al., 2009; Gao J. et al., 2012; Lathi R. B. et al., 2012; Viaggi C. D. et al. 2013; Levy B. et al., 2014; Bug S. et al., 2014; Lin S. B. et al., 2015; Rosenfeld J. A. et al., 2015; Shen J. et al., 2016; Sahoo T. et al., 2017; Wang Y. et al., 2017; Pauta M. et al., 2018]. Тем не менее, в основном эти исследования сосредоточены на оценке диагностической ценности и эффективности ХМА и NGS в образцах продуктов зачатия (РОС) и проводились на небольших выборках. Более того, хотя известно, что крупные CNV могут привести к невынашиванию беременности в силу хромосомного дисбаланса, существует крайне мало работ о конкретных регионах CNV и генах-кандидатах, которые ассоциированы с потерей беременности и эмбриональной гибелью. В работе 2020 года с помощью aCGH было обследовано 5003 спонтанных абортусов, у которых в 59,1% (2955/5003) были выявлены клинически значимые хромосомные аномалии [Wang Y. et al., 2020]. Большую часть аномалий

представляли собой трисомии и полиплоидии: теоретически из 2955 СА с аномальными кариотипами 2879 (97,4%) могут быть обнаружены с помощью традиционного цитогенетического анализа (> 10 Мб). То есть на долю микроструктурных вариантов пришлось всего 76 CNV (1,5% от всех обследованных СА) (Рисунок 2).

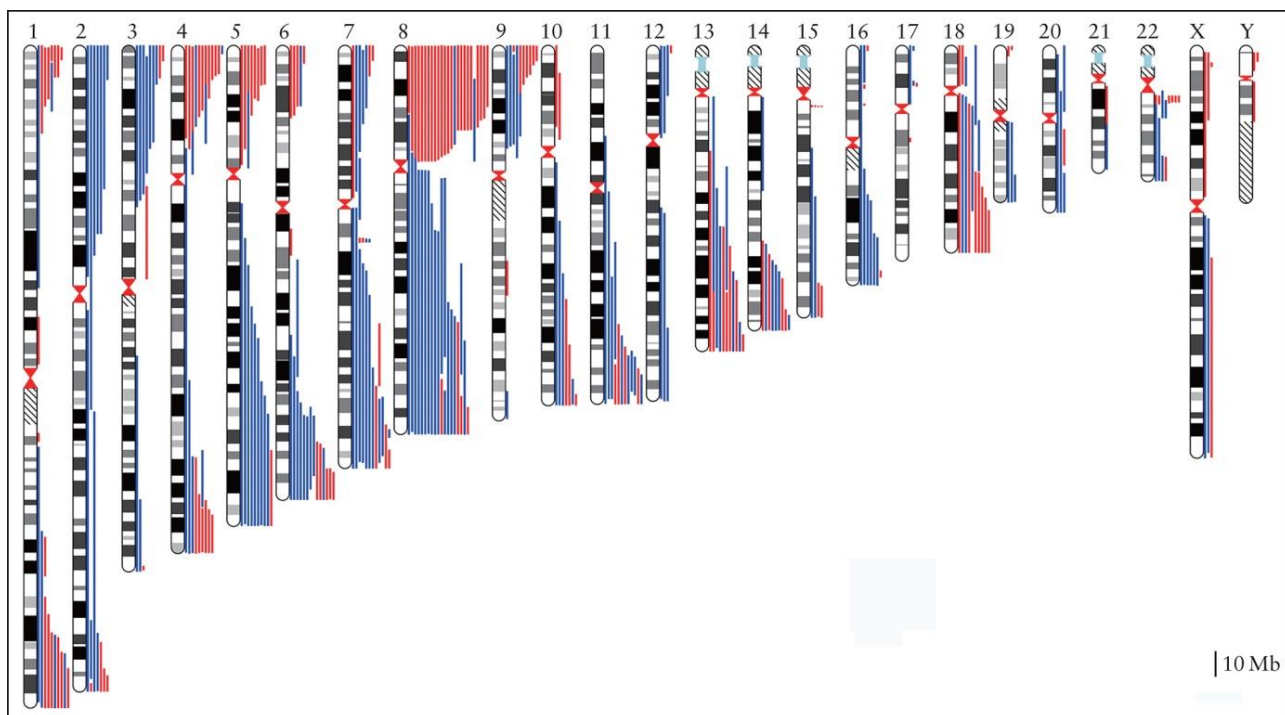


Рисунок 2 - Распространение вариаций числа копий (CNV) и субмикроскопических патогенных CNV в случаях невынашивания беременности [Wang Y. et al., 2020]. Делеции обозначены красным, а дупликации синим.

На долю X-сцепленных микроструктурных вариантов пришлось 16 CNV, большую часть из которых представляли собой варианты региона Xp22.31 (8 дупликаций и 4 делеции). Но авторы не анализировали статус инактивации X-хромосомы в своем исследовании, что не позволяет сделать полноценные выводы о патогенности выявленных CNV. К тому же, последнее исследование 87 спонтанных абортусов предполагает полиморфный характер CNV в регионе Xp22.31 [Hu H. et al., 2023]. Регион Xp22.31 представляет собой крайне нестабильную область с частыми перестройками [Liu P. et al., 2011]. Известно, что дисбаланс Xp22.31 (включая

делеции и дупликации) является одной из наиболее часто выявляемых CNV при пренатальной диагностике. Типичная делеция в Xp22.31 имеет размер приблизительно 1,6 Мб и охватывает гены, кодирующие белки *STS*, *HDHD1/PUDP*, *PNPLA4* и *VCX*. Делеция Xp22.31 классифицируется как патогенный вариант в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики [Riggs E. R. et al., 2020] и приводит к ихтиозу, которым в основном страдают мужчины. Но в случае дупликации Xp22.31 не выявлено различий между полами, что приводит к дискуссии о патогенности дупликаций Xp22.31. Так, есть ряд публикаций, где у пациентов с УО выявлена дупликация региона Xp22.31, включающая в себя ген стероидсульфатазы (*STS*, OMIM 300747) [Esplin E. et al., 2014, Ravone P. et al., 2018]. Ген *STS* кодирует стероидную сульфатазу и дефицит транскрипта этого гена приводит к развитию X-сцепленного ихтиоза. Однако этот ген также показывает сильную экспрессию в плаценте при нормальной беременности, в том числе в выработке эстрогена, что может привести к нарушениям репродуктивной функции у женщин-носительниц [Leon L. et al. 2008]. Делеция этого гена и соседних областей обнаруживается у 90% пораженных людей и происходит из-за рекомбинации между низкокопийными повторами (LCR), расположенными рядом с геном *VCX*, которые фланкируют *STS* [Esplin E., 2014]. Некоторые пациенты с делецией также имеют УО и, кроме того, показана связь между дефицитом транскрипции *STS* и предрасположенностью к синдрому дефицита внимания и гиперактивности, аутизму и дефициту социальной коммуникации. Патогенетическая роль дупликация этого региона до настоящего времени не подтверждена. Первоначальные исследования на больших группах индивидов выявили, что частота этой дупликации составляет 0,15% в здоровой контрольной популяции, и примерно 0,41% в когорте людей с аномальными фенотипами, включающими умственную отсталость. Однако во всех этих исследованиях нет данных о наличии репродуктивных проблем у женщин-носительниц [Li F. et al., 2010; Liu P. et al., 2011]. Размер

дупликации Хр22.31 варьирует от 149 т.п.н. до 1,74 млн.п.н. А соотношение мужчин и женщин, несущих эту перестройку, составляет 0,7. У всех носительниц перестройки (и бессимптомных, и с клиническими проявлениями) инаktivация Х-хромосомы не имела строгой категоричности и варьировала от равновероятной до асимметричной, однако, у 80% бессимптомных гетерозигот наблюдалась асимметричная ХCI [Li F. et al., 2010].

На плейотропизм клинической картины микроструктурных Х-сцепленных вариантов может оказывать влияние ряд генетических механизмов, таких как неполная пенетрантность, переменная экспрессивность и асимметричная Х-инаktivация. Доброкачественный вариант также может вести себя по-разному в разных популяциях или с разным геномным фоном и может вызывать патологический фенотип при различных условиях.

1.2.2 Инаktivация Х-хромосомы как критерий патогенности CNV

Одним из основных механизмов возникновения неслучайной асимметричной инаktivации Х-хромосомы предполагают следующую последовательность событий. Если на стадии бластогенеза появились клетки, содержащие Х-хромосомы с несбалансированными структурными аномалиями, то они теряют способность к росту и/или выживанию и постепенно элиминируются при непрерывном митозе. Таким образом, преимущественно останутся те клетки, не содержащие Х-сцепленные мутации или же клетки с преимущественной инаktivацией Х-хромосом с мутацией, которая будет подавлять транскрипцию генов с мутацией. Поэтому предполагается, что несбалансированные аномалии на Х-хромосоме оказывают меньшее фенотипическое влияние, чем аномалии аналогичного размера с участием аутосом [Ørstavik K.H. et al., 2009]

Инаktivация может распространяться на всю Х-хромосому, но есть гены, избегающие ХCI. Они распределяются неслучайным образом по Х-

хромосоме: гораздо большее количество этих генов локализовано на дистальном коротком плече X-хромосомы человека - Xp (21%), чем на длинном плече - Xq (3%) [Disteche C.M., 1999]. Этот момент крайне важен для генетического консультирования: структурный дисбаланс короткого плеча X-хромосомы имеет большее клиническое значение, чем дисбаланс длинного плеча X-хромосомы, где наличие CNV может быть компенсировано эффектом X-инактивации.

Так, в 2007 году Madrigal I. с соавторами провели исследование на 54 пациентах с умственной отсталостью и выявили 7 кандидатных регионов CNV в X-хромосоме (Xp22.33; Xp22.31; Xp21.2; Xp11.23; Xq26.3; Xq28), из которых 4 CNV локализованы на коротком плече, при этом в 50% случаев у матерей пациентов выявлена асимметричная инактивация в образцах крови. Однако в публикации не был указан репродуктивный анамнез матерей этих пациентов [Madrigal I. et al. 2007].

В более позднем исследовании Basit S. et al. провели генотипирование 2,5 миллиона SNP у 10 человек из семьи из 4 поколений, в которой подозревали X-сцепленную умственную отсталость. Анализ данных полногеномного генотипирования идентифицировал единственную дупликацию Xq21.31–q21.32 размером 3,95 Мб у пяти мужчин с умственной отсталостью. Эта CNV унаследована от здоровых матерей. Проведенный анализ инактивации X-хромосомы показал наличие sXCI у клинически здоровых матерей-носительниц и сестер-носительниц [Basit S. et al. 2016].

Несмотря на то, что считается, что X-хромосомы с несбалансированными структурными аномалиями избирательно инактивированы, чаще всего анализ статуса XCI используется как дополнительный метод верификации клинического полиморфизма и при этом только ретроспективно. Стандартным алгоритмом является следующая последовательность действий: выявление и верификация X-сцепленной патологии, а после этого исключение влияния инактивации X-хромосомы, что приводит к более длительной постановке диагноза. Практически нет

работ, посвященных поиску X-сцепленных CNV при выявлении асимметричной инактивации X-хромосомы. Но вместе с тем накапливаются данные по X-сцепленным CNV, полученные вне связи с инактивацией X-хромосомы, при нарушениях репродукции [Zhang Y. X. et al., 2009; Warren J. E. et al., 2009; Gao J. et al., 2012; Lathi R. B. et al., 2012; Viaggi C. D. et al. 2013; Levy B. et al., 2014; Bug S. et al., 2014; Lin S. B. et al., 2015; Rosenfeld J. A. et al., 2015; Shen J. et al., 2016 Sahoo T. et al., 2017; Wang Y. et al., 2017; Pauta M. et al., 2018; Wang Y. et al., 2020].

Что касается антеспецифических исследований инактивации X-хромосомы (прегравидарная или пренатальная диагностика), то чаще всего они являются следствием уже установленного диагноза X-сцепленного заболевания у кого-то из родственников в семье, но не как скрининг для выявления потенциальных пациентов в группе риска носительства X-сцепленной патологии. Примером такого подхода можно привести исследование 2021 года, где Zhao Y. с соавторами провели анализ X-инактивации в 4-х семьях с унаследованными от матерей патогенными X-сцепленными делециями размером более 1 Мб. В том числе был проведен пренатальный XCI-анализ у плода, являющегося гетерозиготным носителем полной делеции *PCDH19*, с использованием некультивируемых амниоцитов, который показал sXCI, что позволило пренатально оценить риск манифестации заболевания [Zhao Y. et al. 2021]. С другой стороны, нередко встречаются работы, где решение о пролонгировании беременности или прерывании в случаях CNV на X-хромосоме принимается на основании гетерозиготного статуса плода, без учета эпигенетических механизмов. Как, например, это было отмечено в работе 2023 года, когда у фенотипически здоровой матери и плода была выявлена гетерозиготная делеция Xq22.1–q22.3, но анализ статуса инактивации X-хромосомы при этом не проводился [Xu H.H. et al., 2023]. Однако проведенный авторами анализ литературы показал, что данная делеция частично пересекается с 56 случаями подобных делеций регионов Xq22.1–q22.3, при этом только в одном случае был описан нормальный

фенотип у женщины за счет инактивации X-хромосомы [Vaglio A. et al., 2006]. Во всех остальных случаях у женщин была выраженная физическая и умственная задержка развития. Очевидно, что определение гетерозиготности мутации на X-хромосоме недостаточно для прогноза здоровья плода, учитывая модифицирующий эффект X-инактивации.

Вариации числа копий участков ДНК или несбалансированные микроструктурные перестройки хромосом могут быть одним из факторов, влияющим на характер инактивации X-хромосомы, особенно в тех случаях, когда в них задействованы гены, контролирующие процессы деления и клеточной пролиферации на ранних этапах преимплантационного развития организма. Выявление асимметричной ХСІ может послужить индикатором наличия структурных хромосомных мутаций, или других генетических вариантов (CNV) на X-хромосоме.

1.3 Невынашивание беременности и эмбриолетальность

Одной из остросоциальных проблем современного общества является чрезвычайно высокая частота репродуктивных потерь: до 30% зачатий элиминируются еще до имплантации, а еще 40% зачатий могут закончиться выкидышем, что приводит к диагнозу такой патологии как «невынашивание беременности» (Рисунок 3) [Macklon N.S. et al., 2002]. Доминирующий вклад в этиологию репродуктивных потерь у человека, особенно на ранних стадиях эмбрионального развития, вносят генетические факторы.

К привычному невынашиванию беременности (ПНБ) относят состояние, определяемое как две или более последовательные клинически распознаваемые потери беременности до 20 недель беременности и затрагивающие 1-2% супружеских пар во всем мире [Ford H.B., Schust D.J., 2009]. В этиологию заболевания входят различные факторы, такие как хромосомные аномалии у родителей (2–5%), изменения матки (10–15%), инфекции (0,5–5%), эндокринологические нарушения (17–20%) и

аутоиммунные заболевания (20%); тем не менее, примерно 50% случаев ПНБ остаются необъяснимыми (идиопатическими) [Jeve Y.B., Davies W., 2014].



Рисунок 3 - Распределение исходов беременности [Macklon N.S. et al., 2002]

Идиопатическое привычное невынашивание беременности (иПНБ) представляет собой крайне тяжелый диагноз как для супружеских пар, так и для лечащих врачей, поскольку высок риск повторного невынашивания беременности из-за отсутствия установленной причины данного состояния, вследствие чего отмечается повышенная психоэмоциональная нагрузка, влекущая за собой психические нарушения различной степени тяжести [Saravolos S.H., Li T.C., 2012].

Основной генетической причиной ПНБ предполагают хромосомные аномалии у родителей (чаще всего структурные), являющиеся причиной НБ до 2-5%. Но развитие молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов детекции наследственных изменений привело к тому, что для установления причины иПНБ необходимо исключить все влияющие на пенетрантность факторы, в том числе асимметричную инактивацию X-хромосомы. Эти данные указывают на то, что иПНБ – это сложное

многофакторное заболевание, требующее использования дополнительных высокоразрешающих методов диагностики с целью создания и улучшения персонализированного подхода к профилактике и лечению невынашивания беременности.

Классическим методом для идентификации анеуплоидий и структурных аномалий при невынашивании беременности является метод дифференциального окрашивания хромосом. Однако данный метод основан на микроскопии и его разрешающая способность ограничена: минимальный размер хромосомных аномалий должен быть от 5 Мб, следовательно, этот метод может идентифицировать только относительно большие структурные аномалии [Moradi S.Z. et al., 2016]. Напротив, при использовании современных ДНК-микрочипов зонды предназначены для нацеливания на несколько сотен тысяч локусов во всем геноме, что облегчает не только оценку анеуплоидии, но и обнаружение субмикроскопических вариаций числа копий (CNV) в диапазоне от 1 т.п.н. до 5 Мб [Feuk L. et al., 2006; Redon R. et al., 2006; Liu S. et al., 2015]. Несомненным преимуществом выбора ДНК-микрочипов для анализа генетического статуса спонтанных абортусов является использование геномной ДНК, а не живых культур клеток как для стандартного кариотипирования, поскольку получение клеточной культуры от абортивного материала ограничено доступностью жизнеспособных клеток эмбриона по истечению некоторого времени после выкидыша.

В настоящее время выявлены некоторые CNV, которые связаны с эмбриолетальностью у человека. В одном из таких исследований Rajcan-Separovic E. с коллегами провели полногеномный анализ CNV у 17 эмбрионов с нормальным кариотипом, у которых были диагностированы множественные пороки и внутриутробная задержка развития (анэмбриония и неразвивающаяся беременность) [Rajcan-Separovic E. et al., 2010]. У пяти эмбрионов было выявлено 6 уникальных вариаций числа копий участков ДНК размером не более 250 kb. Две из них возникли *de novo* (dup13q32.1 и dup10p15.1), для одной CNV установить родительское происхождение не

удалось (dup17p13.1), а оставшиеся три, в том числе дупликация на X-хромосоме, были унаследованы от кого-либо из родителей (del1q25.3, dupXq28, del7p14.3). В другой работе того же коллектива авторов, опубликованной также в 2010 году, было исследовано 26 зародышей, полученных от пар с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) [Rajcan-Separovic E. et al., 2010]. У 13 абортусов, полученных от восьми таких пар, было обнаружено 11 уникальных вариаций числа копий участков ДНК, размером не более 500 kb, при этом все они были унаследованы от кого-либо из родителей: del6q26, del16q23.1, del5q12.1, dup17q25.3, del15q22.1, dupXp22.2, del5q23.3, dup11p15.1, dup7p14.1, dupXp22.31, del14q13.1, dup19q13.41. Позднее, в работе Wen с соавторами, посвященной изучению CNV у спонтанных абортусов первого триместра беременности, путем анализа экспрессии 14 выявленных ранее и вовлеченных в CNV генов, было показано, что 6 из них экспрессировались в ворсинах хориона, а у трех наблюдалось отклонение от нормального уровня транскрипции РНК и синтеза белка, из-за унаследованных от матери CNV [Wen J. et al., 2015]. Эти гены были вовлечены в dupXp22.2 (*TRAPPC2* и *OFD1*) или были разорваны дупликацией 17q25.3 (*TIMP2*).

Кроме того, показана роль несбалансированных хромосомных мутаций в патогенезе спонтанного прерывания беременности – от 1 до 13% спонтанных абортусов имеют в своем кариотипе микроструктурные перестройки хромосом [Bagheri H. et al., 2015]. Проведенный в 2022 году ретроспективный анализ 24900 спонтанных абортусов показал, что в 55,8% (13 910 образцов) выявлены генетические причины невынашивания беременности, представленные как геномными мутациями - аутосомными трисомиями (64,7%), полиплоидиями (13,9%) и т.д., так и микроструктурными перестройками: выявлены CNV в 600 образцах (2,4% случаев), которые приводят к определенным синдромам микроделеций или микродупликаций [Finley J. et al., 2022].

Что касается связи характера инактивации X-хромосомы с невынашиванием беременности, то этому вопросу посвящено ограниченное число исследований. Так, в мета-анализе Sui с соавторами показала, что у женщин, имеющих три и более случаев невынашивания беременности в анамнезе, статистически значимо чаще наблюдается смещение $XCI \geq 90\%$. Более того, при показателе sXCI от 95% риск привычного невынашивания беременности возрастает более чем в 4 раза. Причины этого феномена остаются неизвестными, но среди наиболее вероятных могут быть мутации или микроструктурные перестройки на X-хромосоме, которые затрагивают гены, отвечающие за рост и эмбриональное развитие [Sui Y. et al., 2015].

Ранее было показано, что у 15% спонтанных абортусов I триместра беременности с кариотипом 46,XX имеется смещение инактивации X-хромосомы [Толмачева Е.Н. и др., 2015]. При этом, наибольшая частота преимущественной инактивации одного из родительских гомологов наблюдалась в группе с наиболее тяжелыми формами нарушений эмбрионального развития (анэмбрионий), а также среди эмбрионов от женщин с привычным невынашиванием беременности. Кроме того, было выявлено, что частота sXCI у женщин с привычным невынашиванием беременности в два раза выше, чем у женщин со спорадическими выкидышами в анамнезе [Толмачева Е.Н. и др., 2018].

У спонтанных абортусов первого триместра беременности наблюдается сдвиг соотношения полов в сторону женского пола [Evdokimova V.N. et al., 2000], поэтому такой эпигенетический маркер, как асимметричная инактивация X-хромосомы у женщин с невынашиванием беременности и у пренатально погибших эмбрионов позволяет сузить выборку для выявления несбалансированных хромосомных мутаций, которые ассоциированы с нарушением нормальной эпигенетической регуляции X-хромосомы, а также вносят вклад в эмбриональную гибель.

В одном из недавних исследований с помощью array-CGH и массового параллельного секвенирования были проанализированы ткани 2186

пренатально погибших эмбрионов [Chen Y. et al., 2017]. Всего было обнаружено 130 CNV с помощью полногеномного секвенирования и еще 24 с помощью микрочиповой диагностики. Выявленные CNV в основном являлись гетерозиготными вариантами или же возникали *de novo*. Делеции и дупликации чаще всего встречались на хромосомах 22 и 18, а также на хромосомах X и 8. В составе 154 CNV было идентифицировано 275 генов, потенциально влияющих на нормальное развитие плода. Три четверти генов приводили к дефектам развития, и примерно 40% из них вызывали эмбриональную летальность в животных моделях, несущих мутантные аллели.

Можно предположить, что микроструктурные перестройки на X-хромосоме, возникшие *de novo* либо унаследованные от матери, вносят определенный вклад в этиологию ранней эмбриональной гибели. Предположительно, преимущественная инактивация X-хромосомы с несбалансированной структурной перестройкой (микроделецией или микродупликацией) у матери будет компенсировать развитие мутантного фенотипа, тогда как у эмбриона мужского пола или у женского эмбриона с равновероятной инактивацией X-хромосомы микроструктурные хромосомные мутации проявятся и приведут к гибели. В свою очередь, хромосомные перестройки на X-хромосоме у эмбриона женского пола *de novo* при инактивации нормального гомолога могут привести к остановке развития зародыша.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 9 от 26.11.2018 года).

Исследование, дизайн которого представлен на рисунке 4, было выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».



Рисунок 4 - Дизайн настоящего исследования

2.2 Характеристика исследуемых групп

Выборки, обследуемые методом «случай-контроль»

В настоящей работе обследовано 448 женщин, которые согласно течению и исходам беременности были разделены на группу женщин с невынашиванием беременности (N=313) и контрольную группу женщин без проблем с репродукцией (N=135). Все женщины подписали информированное согласие на участие в научном исследовании.

Группа женщин с невынашиванием беременности (N=313) распределялась на две подгруппы в зависимости от акушерского анамнеза: у 156 женщин в анамнезе был единственный случай невынашивания беременности, а у 157 женщин поставлен диагноз «привычное невынашивание беременности» (ПНБ, два и более выкидыша в анамнезе).

Были сформированы выборки, состоящие из 152 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX и 88 индуцированных (медицинских) абортусов с кариотипом 46,XX. Кариотип оценивался с помощью стандартного цитогенетического анализа на препаратах метафазных хромосом, полученных в культуре фибробластов экстраэмбриональной мезодермы [Лебедев И.Н., Никитина Т.В., 2013] или на прямых препаратах хориона [Баранов В.С., Кузнецова Т.В., 2007]. Верификация кариотипа 46,XX проводилась с помощью двух методов: анализа наличия гена *SRY* и мультиплексного ПЦР-анализа 26-ти полиморфных локусов геномной ДНК (Рисунок 5). В результате в исследование вошли выборки, состоящие из 94 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX и 64 индуцированных (медицинских) абортусов с кариотипом 46,XX.

Спонтанные абортусы были получены от женщин с клиническими диагнозами «неразвивающаяся беременность» или «анэмбриония», поставленными по результатам динамического ультразвукового исследования.

Индукцированные абортусы были получены от здоровых женщин, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность по социальным показаниям. Продолжительность внутриутробного развития зародышей, определенная по дате последней менструации, составляла у спонтанных абортусов – $11,1 \pm 3,5$ недель, а у медицинских абортусов – $9,1 \pm 2,0$ недель и статистически значимо не различалась в сравниваемых группах ($p = 0,24$).

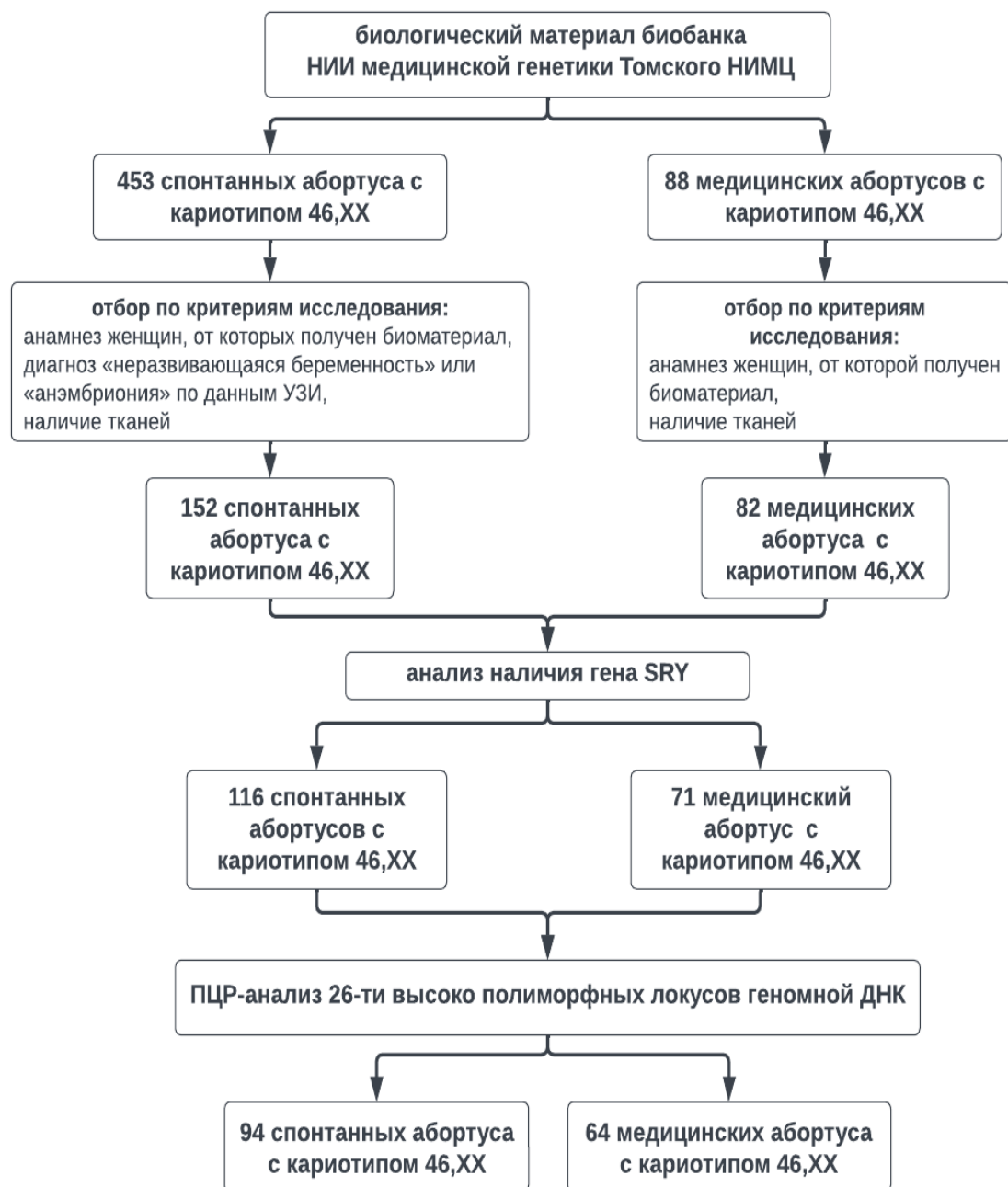


Рисунок 5 - Схема отбора спонтанных и медицинских абортусов и последующей верификации кариотипа 46,XX

Данные о биологическом возрасте эмбрионов, определенном по данным ультразвукового исследования, имелись только для части спонтанных абортусов ($n = 19$, $7,2 \pm 2,9$ недель).

Разность между гестационным и менструальным возрастом, отражающая задержку развития эмбриона и время, прошедшее с момента его гибели до момента получения биологического материала для исследования, составляла в группе спонтанных абортусов $3,1 \pm 1,5$ недели.

Анализировали две внезародышевые ткани – ворсинчатый трофобласт хориона и экстраэмбриональную мезодерму, являющиеся производными трофэктодермы и эпибласта внутренней клеточной массы соответственно, и имеющие существенные отличия в характере метилирования генома.

2.3. Молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования

2.3.1. Выделение ДНК фенол-хлороформным методом

Кровь женщин с невынашиванием беременности и женщин без проблем с репродукцией забирали с помощью стандартной процедуры из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Образцы крови женщин хранились в холодильнике при -20°C , перед процедурой выделения ДНК кровь размораживали при комнатной температуре и перемешивали. В пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл наливали 0,7 мл крови, затем добавляли 0,7 мл $1\times\text{SSC}$, перемешивали с помощью центрифуги Vortex и откручивали на микроцентрифуге 2 мин со скоростью 12000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали и, предварительно перемешав, повторяли предыдущий цикл центрифугирования. Затем повторно добавляли раствор SSC ($1\times$) 1,4 мл. Осадок разбивали пипетированием и затем осаждали центрифугированием в том же режиме. Вновь сливали надосадочную жидкость, последнюю каплю промокали фильтровальной бумагой.

На следующем этапе добавляли к осадку 270 мкл 0,3 М ацетата натрия, разбивали осадок и хорошо перемешивали до полной гомогенизации. Затем последовательно добавляли 30 мкл 10% SDS и 8 мкл протеинкиназы К, перемешивая после добавления каждого реактива. Далее образец инкубировали в течение одного часа при температуре 37°C, перемешивая каждые 10 минут.

Следующий этап проводили в ламинарном шкафу: добавляли к образцу 400 мкл смеси фенола и хлороформа (в соотношении 1:1). Перемешивали на шейкере в течение 8 мин до образования однородной смеси и центрифугировали 2 мин на 12000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в чистую микропробирку, не захватывая интерфазу. Приливали 400 мкл хлороформа, повторяли этапы перемешивания и центрифугирования. Далее отбирали верхнюю фракцию без интерфазы в новую пробирку «Эппендорф».

На последующем этапе к перенесенному супернатанту добавляли 1 мл 96% этанола. Плавными движениями вращали пробирку, тем самым накручивали ДНК саму на себя. Осаждали центрифугированием в течение 5 минут при скорости 12000 об/мин. Затем аккуратно сливали спирт и отмывали осадок в 1 мл 70% спирта с последующим откручиванием в том же режиме. После чего вновь отбирали спирт, промокали край пробирки в фильтровальную бумагу, контролируя наличие ДНК на дне «Эппендорфа». Сушили пробирку с открытой крышкой с использованием концентратора (Eppendorf, Германия) в соответствующем режиме при 30°C в течение 5-7 минут. Затем ДНК растворяли путем добавления 100 мкл TE-буфера и инкубировали в термостате при температуре 42°C 2 часа. Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C.

Геномную ДНК спонтанных абортусов выделяли из внезародышевой мезодермы методом фенол-хлороформной экстракции.

2.3.2. ПЦР-анализ наличия гена *SRY*

Амплификацию ДНК проводили на C 1000TM Thermal Cycler BIO-RAD с использованием следующих реагентов:

- Деионизированная вода
- 2,5 mM dNTP
- 25 mM MgCl₂

В качестве праймеров для амплификации ДНК были использованы нуклеотидные последовательности к локусу *SRY*. Олигонуклеотидные праймеры для локусов *AR* были синтезированы фирмой Applied Biosystems.

For: 5'- TCAGCAGGGCAAGTAGTC-3'

Rev: 5'- GTGGCTTTTCGTACAGTCATC-3'

- 10мкМ каждого олигонуклеотида в реакцию.

Для проверки наличия продукта ПЦР, а также для проверки качества проведенной амплификации ДНК, были отобраны по 5 мкл продукта ПЦР для фракционирования методом электрофореза в агарозном геле.

Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в 2,5% агарозном геле. В состав геля входил 50х буфер TAE (40 mM Tris-HCl – pH 8.0, 20 mM ацетат натрия, 1 mM EDTA), бромистый этидий (10 мкг/мл) как интеркалирующий агент. Дополнительно в последнюю лунку добавлялся маркер длин фрагментов ДНК pUC19/MspI ДНК с концентрацией 0.5 мкг/мкл в буфере (10 mM Tris-HCl – pH 7.8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl). Он предназначался для оценки путем сравнения интенсивности фрагментов одинакового размера. Обработку результатов электрофореза проводили с использованием гель-документирующей установки «ChemiDoc XRS».

2.3.3. Мультиплексный ПЦР-анализ 26-ти полиморфных локусов геномной ДНК

Для исключения контаминации и проверки STR-профилей 57 спонтанных абортусов женского кариотипа и их родителей дополнительно

было проведено исследование 26-ти полиморфных локусов геномной ДНК с использованием набора «COrDIS ЭКСПЕРТ 26».

COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 26-ти высоко полиморфных локусов геномной ДНК человека: *AMEL*, *SRY*, *D3S1358*, *TH01*, *D12S391*, *D5S818*, *TPOX*, *Yindel*, *D2S441*, *D7S820*, *D13S317*, *FGA*, *D22S1045*, *D18S51*, *D16S539*, *D8S1179*, *CSF1PO*, *D6S1043*, *vWA*, *D21S11*, *SE33*, *D10S1248*, *D1S1656*, *D19S433*, *D2S1338*, *DYS391*.

Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией. В наборе используется пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременной детекции в разных каналах флуоресценции. Праймеры мечены пятью флуоресцентными красителями, детектируемыми в каналах Blue, Green, Yellow, Red, Purple. Стандарт длины S550 мечен шестым флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале Orange одновременно с продуктами ПЦР.

2.3.4. Метил-чувствительная ПЦР высокополиморфного экзона I гена рецептора андрогена (AR) и фрагментный анализ

Для оценки характера инактивации X-хромосомы использовали метод, основанный на метил-чувствительной ПЦР высокополиморфного экзона I гена рецептора андрогена (AR) и последующего фрагментного анализа [Allen R.S. et al., 1992]. Матрицей служили образцы нативной ДНК и ДНК, предварительно ферментативно расщепленной метил-чувствительной эндонуклеазой HpaII. Ген рецептора андрогена AR локализован в регионе Xq11-12. В первом экзоне этого гена находятся CAG-повтор, кодирующий полиглутаминовый участок. Метилирование HpaII сайта, расположенного вблизи CAG-тракта гена, строго коррелирует с неактивным состоянием X-

хромосомы, а высокий полиморфизм этого участка позволяет достаточно эффективно различать X-хромосомы разного родительского происхождения.

Принципиальным преимуществом анализа *AR* для измерения паттернов X-инактивации является высокая гетерозиготность *CAG*-повтора вблизи 5'-конца. Поэтому все образцы, гомозиготные по *AR*, были исключены из дальнейшего анализа.

Гидролиз ДНК метилчувствительной эндонуклеазой Hpa II

Были подготовлены по две пробирки, содержащие один и тот же образец ДНК. В пробирку с нативной ДНК, которая маркировалась как I, добавляли деионизированную воду, 450 мкг образца ДНК, 1 мкл 10x SE-Buffer В для фермента Hpa II и 10 мкл минерального масла. В другую пробирку, которая маркировалась как II, добавляли деионизированную воду, 450 мкг образца ДНК, 1 мкл 10x SE-Buffer В для фермента Hpa II, 1 мкл метилчувствительной эндонуклеазы Hpa II и 10 мкл минерального масла.

Аmplификацию ДНК проводили на C 1000TM Thermal Cycler BIO-RAD с использованием следующих реагентов:

- Деионизированная вода
- 2,5 mM dNTP
- 1X Hot-start Taq-polymerasa Buffer
- 1 единица Hot-Start Taq DNA Polymerase
- 25 mM MgCl₂

В качестве праймеров для амплификации ДНК были использованы нуклеотидные последовательности к локусам *AR*. Прямой праймер был мечен флуоресцентным красителем FAM:

For 5'-FAM-TCCAGAATCTGTTCCAGAGC-3'

Rev 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCC-3'

- 10мкМ каждого олигонуклеотида в реакцию.

Для проверки наличия продукта ПЦР, а также для проверки качества проведенной амплификации ДНК, были отобраны по 5 мкл продукта ПЦР для фракционирования методом электрофореза в агарозном геле.

Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в 2,5% агарозном геле. В состав геля входил 50× буфер TAE (40 mM Tris-HCl – pH 8.0, 20 mM ацетат натрия, 1 mM EDTA), бромистый этидий (10 мкг/мл) как интеркалирующий агент. Дополнительно в последнюю лунку добавлялся маркер длин фрагментов ДНК pUC19/MspI ДНК с концентрацией 0,5 мкг/мкл в буфере (10 mM Tris-HCl – pH 7,8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl). Он предназначался для оценки путем сравнения интенсивности фрагментов одинакового размера. Обработку результатов электрофореза проводили с использованием гель-документирующей установки «ChemiDoc XRS».

Анализ бэндов локуса AR проводился на генетическом анализаторе (секвенаторе) ABI Prism 3730xl 9. В основе генетического анализатора лежит капиллярный электрофорез с индуцированной лазером флуоресценцией. Разделение фрагментов ДНК идёт в тонком капилляре, заполненном электролитом, в зависимости от массы и заряда. Для работы использовали новый или проавтоклавированный 96-ти луночный планшет. В каждую лунку добавляли по 10 мкл смеси формамида Hi-Di и стандарта размера LIZ600. Затем добавляли по 1 мкл ДНК образцов. Затем планшет центрифугировали и проводили денатурацию ДНК при 95°C в течение 10 мин. Полученную информацию обрабатывали с помощью сопряженного программного обеспечения GeneMapper.

Степень инактивации X-хромосомы рассчитывали по формуле [Lau et al., 1997]:

$$\frac{(Bd1/Bu1)}{(Bd1/Bu1 + Bd2/Bu2)}$$

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 – аллели, соответствующие интенсивности пиков, продуцируемых не рестрицированными аллелями.

Уровень $XCI < 90\%$ соответствует равновероятному характеру инактивации, $XCI \geq 90\%$ принимается как асимметричная инактивация (Рисунок 6).

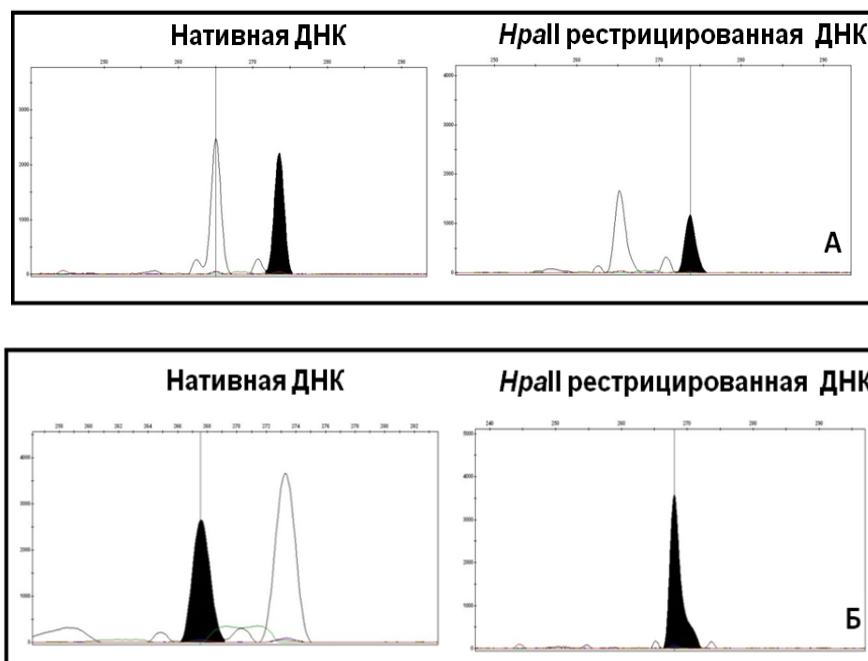


Рисунок 6 - Результаты фрагментного анализа экзона 1 гена *AR* после метил-чувствительной ПЦР. А – равновероятная инактивация X-хромосомы, Б – асимметричная инактивация X-хромосомы

2.3.5. Матричная сравнительная геномная гибридизация (array

Comparative Genomic Hybridization, aCGH)

Поиск микроструктурных перестроек был выполнен с помощью метода aCGH с использованием набора микрочипов SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) в соответствии с рекомендациями производителя (Рисунок 7).

Мечение и гибридизацию ДНК субъекта и эталонной ДНК (№ 5190-3796, эталонная ДНК человека, Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) выполняли с использованием протоколов ферментативного мечения и гибридизации (версия 7.5 Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США).

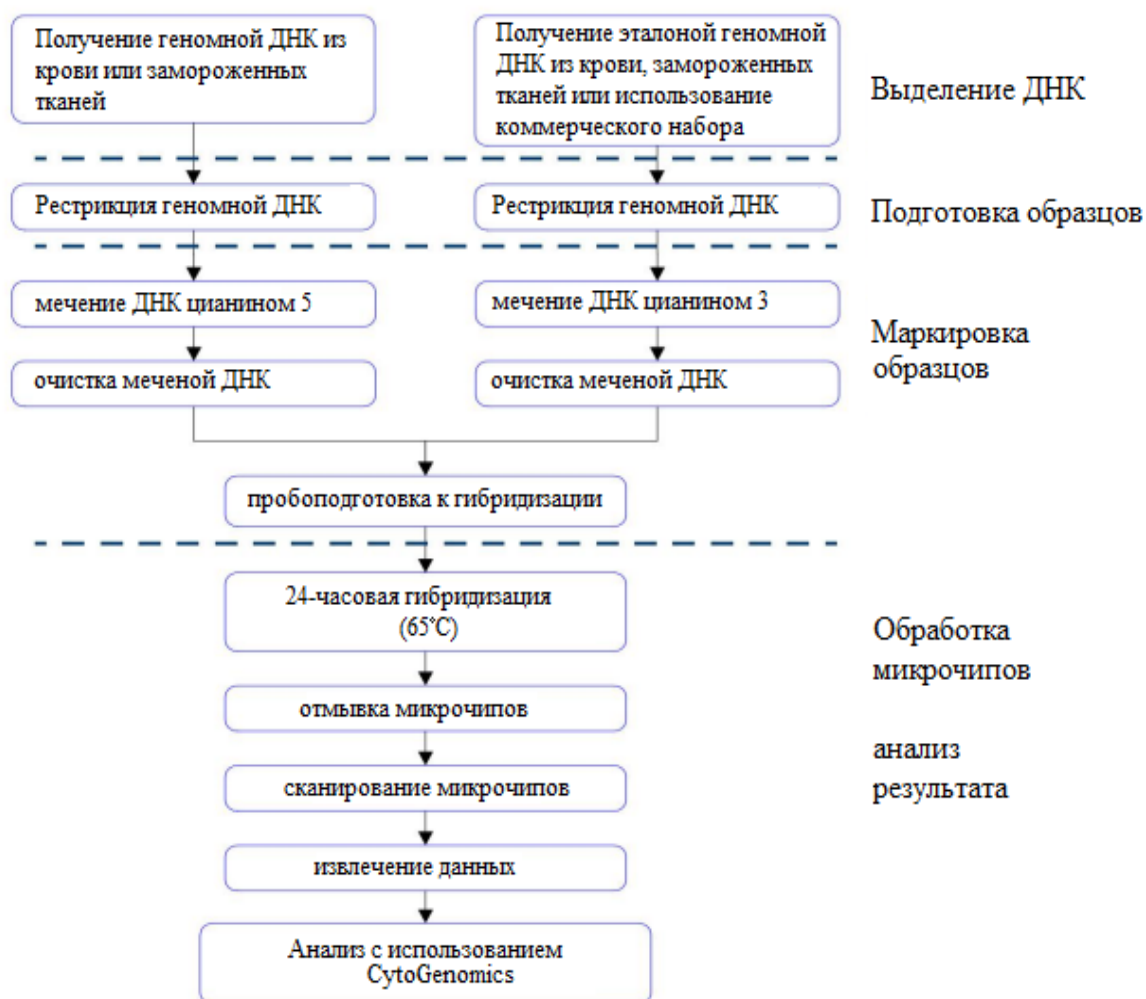


Рисунок 7 - Схема амплификации геномной ДНК, рекомендуемая компанией Agilent

Изображения массивов были получены с помощью сканера микрочипов Agilent SureScan (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения Cytogenomics (версия 3.0.6.6) (Agilent Technologies), общедоступной базы данных геномных вариантов (DGV) и базы данных хромосомного дисбаланса и фенотипа у людей с использованием ресурсов Ensembl (DECIPHER). Аннотации генов, расположенных в области геномного дисбаланса, были получены из базы данных генов NCBI, Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) и литературы.

Матричную сравнительную геномную гибридизацию проводили по протоколу, рекомендованному производителем (Agilent Technologies, США).

1. Подготовка геномной ДНК

На этапе подготовки геномной ДНК для проведения молекулярно-цитогенетического исследования определяли концентрацию и качество исследуемых образцов ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, США). Для гибридизации на микрочипе использовались образцы, удовлетворяющие следующим требованиям:

А) Оптимальная концентрация ДНК должна составлять 100-300 нг/мкл. В отклоняющихся случаях необходимой концентрации добивались путем добавления исходной ДНК к образцу или дополнительным разведением ТЕ-буфером.

Б) ДНК должна быть свободной от белковых примесей и солей при показателях 1,8-2,0 и > 1 соответственно. Степень чистоты ДНК от белковых примесей и солей оценивалась соотношениями A260/A280 и A260/A230.

Далее определялся средний размер фрагментов ДНК для каждого образца с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, окрашенном этидием бромидом (0,01 мкг/мкл), для приготовления которого смешивали 0,5 г агарозы, 1 мл ТАЕ, 50 мл воды, в плоскодонной колбе на 100 мл. Вслед за нагреванием смеси в микроволновой печи до растворения агарозы ее охлаждали до 50–60 °С, и, тщательно перемешивая, добавляли этидиум бромид (0,01 мкг/мкл). Заливали раствор на подложку для геля и, после того, как гель полностью сформировался, аккуратно удаляли гребенки и помещали гель в электрофоретическую камеру, предварительно промытую под проточной и дистиллированной водой (10 и 5 раз, соответственно). Затем визуализировали фрагменты ДНК в проходящем УФ-свете в геле-документирующей системе «GelDoc» (Bio-Rad, США).

После оценки качества готовили водные растворы ДНК для каждого образца объемом 13 мкл (для микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8×60K (Agilent Technologies, США) с общим содержанием ДНК 500 нг. Раствор ДНК инкубировали ночь при комнатной температуре для лучшего растворения ДНК

2. Энзиматическое мечение образцов ДНК

При подготовке к мечению ДНК проводили центрифугирование образцов со скоростью 7900 об/мин (6000 g) в течение 1 мин с целью удаления содержимого со стенок и крышки пробирок. Затем добавляли 5 мкл праймера Random Primer, перемешивая пипетированием. Пробы инкубировали в твердотельном термостате при 98 °С в течение 10 мин, а далее 5 мин на льду. Затем повторяли цикл центрифугирования в том же режиме.

Для мечения геномной ДНК на льду готовили растворы флуоресцентных красителей цианин 3-dUTP (для контрольного образца ДНК) и цианин 5-dUTP (для исследуемого образца ДНК). Расчет количества реактивов на одну реакцию проводили в следующих пропорциях:

1. 5 мкл 5× буфера
2. 2,5 мкл 10× раствора dNTP
3. 1,5 мкл цианин 3-dUTP или цианин 5-dUTP
4. 0,5 мкл фермента Eho (-) Klenow.

К каждому образцу ДНК добавляли по 9,5 мкл приготовленной смеси и аккуратно перемешивали пипетированием. Затем образцы инкубировали в ДНК-амплификаторе с нагревающейся крышкой (Bio-Rad, США) при 37°С в течение 2 ч и при 65°С в течение 10 минут для инактивации фермента и переносили на лед.

3. Очистка меченых образцов ДНК

Меченые образцы центрифугировали 1 мин при 7900 об/мин (6000 g) для удаления конденсата со стенок и крышки пробирки. В 2 мл пробирки помещали колонки для очистки, добавляя 430 мкл TE-буфера (pH 8.0) и переносили в них меченую ДНК, аккуратно перемешивали пипетированием. Далее образцы центрифугировали в течение 10 минут при 14000 g в условиях комнатной температуры, после окончания удаляли жидкость из пробирки. В ту же пробирку вновь помещали колонку, добавляли 480 мкл TE-буфера и повторяли центрифугирование. Затем, для извлечения очищенных образцов,

колонку, перевернув, переносили в новую 2 мл пробирку и центрифугировали в течение 1 минуты при 1000 g при комнатной температуре. Образцы высушивали в концентраторе (Concentrator plus, Eppendorf, Германия) и растворяли в 9,5 мкл ТЕбуфера, после чего инкубировали на льду в течение 5 минут и перемешивали пипетированием 10 раз. Определяли выход ДНК в 1,0 мкл образца с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, США) и степень мечения (специфическую активность), которую рассчитывали по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{пмоль/мкл красителя}}{\text{мкг/мкл геномной ДНК}}$$

С учётом изначального содержания ДНК в растворе 500 нг, выход должен был составлять порядка 8-11 мкг, специфическая активность образца, меченного цианином 3 (Cy3-dUTP) – 20-35 пмоль/мкг, а меченого цианином 5 (Cy5-dUTP) – 20-30 пмоль/мкг.

4. Подготовка меченой ДНК к гибридизации

Готовили стоковый раствор 10× блокирующего агента, путем добавления 1350 мкл стерильной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный 10× aCGH блокирующий агент. Проводили инкубацию раствора при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего перемешивали на центрифуге Vortex. Блокирующий агент хранили при -20 °С.

Для приготовления гибридизационной смеси из расчета на 1 образец использовали следующие составляющие:

1. 2 мкл C₀t-1 ДНК (1 мг/мл)
2. 4,5 мкл 10× aCGH блокирующего агента («Blocking Agent»)
3. 22,5 мкл 10× HI-RPM гибридизационного буфера («HI-RPM Hybridization Buffer»).

29 мкл гибридизационной смеси вносили в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую смесь опытной и контрольной меченых ДНК, перемешивали

пипетированием и центрифугированием на Vortex, для удаления конденсата. Затем производили два последовательных этапа инкубации образцов при различных условиях: 1) 3 минуты при 98 °C 2) 30 минут при 37 °C. В завершение подготовки к гибридизации образцы центрифугировали со скоростью 7900 об/мин (6000 g) в течение 1 минуты.

5. Гибридизация и отмывка

Слайд с отсеками для образцов помещали в камеру Agilent SureHyb. В каждый из 4 отсеков слайда медленно вносили 29 мкл гибридизационной смеси, при этом остальные образцы хранились при 37 °C до внесения их на слайд. После внесения всех образцов, слайд с отсеками накрывали микрочиповым слайдом активной стороной вниз, так, чтобы штрих-код оказывался сверху. Слайды прочно прижимали друг к другу и вращали камеру для распределения смеси по всему отсеку и оценки подвижности пузырька воздуха в нём.

Затем камеру со слайдами помещали в гибридизационную печь и инкубировали со скоростью 20 об/мин при 67 °C в течение 24 часов.

Для отмывки слайдов использовали 2 буфера: «Agilent Oligo aCGH/ChIP-onChip Wash Buffer 1» (отмывочный буфер 1) и «Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2» (отмывочный буфер 2). Буфер 2 переливали в отдельную бутылку и инкубировали ночь при 37 °C. В день отмывки слайд с отсеками отделяли от микрочипового слайда в емкости с буфером 1. После чего отмывали микрочиповый слайд в буфере 1 при комнатной температуре на магнитной мешалке в течение 5 мин, затем в буфере 2 в течение 1 мин. Извлекали слайд из буфера и помещали в держатель для слайдов и сканировали в сканнере для чтения флюоресцентных сигналов с микрочипов SureScan Microarray (Agilent Technologies, США).

Данные получали с помощью программы Scan (v. 9.1.1.1) и визуализировали в программе Cytogenomics (v. 3.0.6.0) (Agilent Technologies, США).

2.3.6. Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (quantitative Real-Time PCR, qPCR)

Количественная ПЦР в реальном времени использовалась для подтверждения CNV, обнаруженных с помощью анализа микрочипов.

Подбор праймеров на исследуемые гены (Таблица 1) осуществлялся с помощью программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) и баз данных Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Проверка специфичности выбранных праймеров проводилась с использованием программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и VectorNTI Advance®11.5.4 (Invitrogen, США).

При подборе оптимальных праймеров учитывались следующие условия:

1. Длина праймера – 18-23 п.н.;
2. Размер продукта амплификации – 80-120 п.н.;
3. Температура плавления (T_m) – 58-60°C, причем T_m праймеров, работающих в паре, должна отличаться не более, чем на 2°C;
4. Содержание C/G – 40-60%;
5. Четыре и более 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплементарны самому праймеру и праймеру в паре, иным синтетическим олигонуклеотидам, добавляемым в реакцию;
6. В составе последовательности не должно быть четыре и более подряд расположенных одинаковых нуклеотида.

Работу проводили в предварительно подготовленном УФ-боксе в соответствии с составленным протоколом о порядке заполнении планшета смесью для ПЦР. Сначала в каждую лунку планшета вносили 2,5 мкл прямого и 2,5 мкл обратного праймеров (1 мкмоль/л) и помещали на лед.

Далее для каждого исследуемого образца ДНК смешивали следующие реакционные компоненты из расчета на одну лунку:

- 5 мкл воды, свободной от ДНКаз и РНКаз,
- 2,5 мкл ДНК,
- 12,5 мкл Maxima™ SYBR Green (Thermo Scientific, США).

Вносили смесь в лунки в соответствии с протоколом проведения ПЦР. Планшет накрывали оптически прозрачной пленкой. Центрифугировали планшет в центрифуге GRANT–BIO LMC3000 в течение 1 минуты со скоростью 1000 об/мин.

Условия ПЦР в режиме реального времени:

- Инициация: 95 °C – 10 мин.
- Элонгация: 95 °C – 15 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (40 циклов).

Проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени в амплификаторе AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, США). После завершения реакции анализировали графики накопления ДНК с помощью компьютерной программы Excel.

Для анализа данных полимеразной цепной реакции использовали пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК – определение значения порогового цикла реакции CT (cycle threshold) как точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии. Суть порогового метода состоит в том, чтобы определить момент St (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК в реакционной пробирке (соответственно, и флуоресцентный сигнал) достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины Nt (задаётся пользователем или программным обеспечением). При сравнении полученных значений St , можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше St (т.е. чем быстрее количество ДНК в данном образце достигло пороговой величины Nt), тем больше было в нем целевой ДНК в начальный момент времени. То есть метод предполагает нахождение некоторого значения на оси абсцисс, характеризующего данную кривую (найденное значение обозначают как CT , выраженное в циклах ПЦР). Полученные значения использовали далее при сопоставлении результатов ПЦР для разных образцов.

Таблица 1 - Структура праймеров для ПЦР в режиме реального времени

№	регион	ген	Последовательность праймера
1	dupXq28	<i>GDI1</i>	F 5'-CAGTGACTGGTGAGGGTGTTTATC-3'
			R 5'-GAGGAAAAGAAAGGCTTAGCACAGT-3'
2	dupXq28	<i>CLIC2</i>	F 5'-GATGAAATTGATCCAGACAGTGC-3'
			R 5'-AGCTACAATCAGCCAGTGTTAG-3'
		<i>VBP1</i>	F 5'-GCCGTGTTTGTGGAAGATGT-3'
			R 5'-TGGTACTGTTCATCCAGCTTCT-3'
		<i>VAMP7</i>	F 5'-GATGGTTTGTTCAGTGTTTCAGATGTT-3'
			R 5'-AAATCCGAACATAGCTGTGTGATTC-3'
3	delXp11.23	<i>ZNF630</i>	F 5'-GAAGAGTGGCAGCAGTTGAAT-3'
			R 5'-CGGAGACCAGGTGATTATAGGTC-3'
4	delXq24	<i>WDR44</i>	F 5'-ATTTCTTCAAAGACCCTCTTCCG-3'
			R 5'-CAGCAGGTGTGAGCACTTTC-3'
5	delXq24	<i>SEPT6</i>	F 5'-ACACTCACGGAAATCTCGGA-3'
			R 5'-ATACAGGCGACCAGGTACTC-3'
		<i>UBE2A</i>	F 5'-GTACCTGGACCTGCGGATAG-3'
			R 5'-GTGAGTGTGTCCTCCACCAG-3'

2.3.7. Мультиплексная лигазная реакция (multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA)

Метод MLPA представляет собой метод мультиплексной ПЦР, используемый для обнаружения аномального количества копий в определенных и ранее известных областях генома, которые связаны с определенным генетическим состоянием.

Для подтверждения дупликации Xp22.33 был использован набор SALSA MLPA Probemix P329 CRLF2-CSF2RA-IL3RA (MRC-Holland, Амстердам, Нидерланды). Смесь зондов P329 содержит 35 зондов MLPA в области PAR1 Xp22.33, которая включает гены *SHOX* (гены гомеобокса, связанные с низким ростом), *CRLF2*, *CSF2RA* и *IL3RA*. В каждом анализе MLPA в качестве отрицательного контроля использовали 3 образца без CNV в исследуемом локусе.

Набор набор SALSA MLPA Probemix P329 CRLF2-CSF2RA-IL3RA (MRC-Holland, Амстердам, Нидерланды) использовался в соответствии с инструкцией производителя. Интерпретация полученных результатов происходила с помощью программного обеспечения Coffalyser от MRC-Holland (Амстердам, Нидерланды).

Сравнение высоты пиков зондов тестового образца с высотой пиков зондов референсного образца отражает относительное число копий соответствующих целевых последовательностей в тестовом образце. Удаление одной или нескольких целевых последовательностей вследствие делеций со всей очевидностью приводит к относительному уменьшению высоты пика, в то время как увеличение относительной высоты пика свидетельствует об амплификации числа целевых последовательностей.

2.3.8. Таргетное секвенирование генов *XIST* и *XACT*

Идентификацию вариантов генов *XIST* и *XACT* у женщин с sXCI проводили с помощью таргетного секвенирования нового поколения (NGS). Для исследуемых генов *XIST* и *XACT* были подобраны праймеры (Таблица 2).

Библиотеки ДНК готовили с использованием набора для подготовки образцов ДНК Nextera XT (24 образца) (Illumina Inc., США) и набора Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, Inc., США).

Концентрацию фрагментов определяли с помощью флуорометра Qubit 3 (Thermo Fisher) с набором для анализа двухцепочечной ДНК (Thermo Fisher), а средний размер фрагмента определяли как 553,5 п.н. с использованием High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies).

Библиотеки секвенировали на секвенаторе MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Micro Kit, v2 (300 циклов) (Illumina Inc., США).

Таблица 2 - Праймеры для генов *XACT* и *XIST*

Праймеры	Последовательность	размер
XACT Exon1_F	GTTTGGGTACAAAGATGCCTAAACA	4406 bp
XACT Exon1_R	TCCACTTTCCTCACTAAATCCAGAG	
XACT Exon2_F	GAACGTGAACCATAGAACAGAGGTT	3710 bp
XACT Exon2_R	GGTGTCATTGGACTGCTAATACCAT	
XACT Exon3_F	ACTCTCTCCACTTTATTGAACTGCT	4878 bp
XACT Exon3_R	TAAATTACTAGCAGGCAGACCACAT	
XACT Exon4_F	CTCATTTTTCATGTTAGCCTACACTC	5493 bp
XACT Exon4_R	CCTAAATCTCAAACAACAGAACACA	
XACT Exon5_F	CCAACGTCTCTGCCATATTTAAGTC	5426 bp
XACT Exon5_R	CCTCCAAATCAGTAATAGCAAGCAG	

Продолжение Таблицы 2 - Праймеры для генов *XACT* и *XIST*

Праймеры	Последовательность	размер
XIST Exon1_F	AAATGAGACTTCAAACCATTTACCC	6234 bp
XIST Exon1_R	TGTTTCTATTACATCTTCTCCACT	
XIST Exon2_F	TTGCTCCTTTCTTTGTATCCACAAC	7855 bp
XIST Exon2_R	ATTGTTGTAGTGCTTCTGTCTTTGG	
XIST Exon3_F	CCAAAGACAGAAGCACTACAACAAT	5160 bp
XIST Exon3_R	GTTATGCAGTAGACCCAAGCAATAC	
XIST Exon5_F	TCAGAAACCCAAGTCTAATTGAAGG	2116 bp
XIST Exon5_R	GTGTATGCCTTTATCATTGCTCCTA	
XIST Exon6_F	TAGGAGCAATGATAAAGGCATACAC	1176 bp
XIST Exon6_R	TCACCTACTTATCAGACAGGAAACT	
XIST Exon7_F	TAACTGAAAATGGTCAAGGAGTCAG	3233 bp
XIST Exon7_R	ATGTTCTTTCTGGTATGTCTTTGCT	
XIST Exon8_F	AGCAAAGACATACCAGAAAGAACAT	1184 bp
XIST Exon8_R	TACCATTGTATTGCACCACTTTACA	
XIST Exon4_F	GTACAGTGATGTTCCAGTCATATCC	8781 bp
XIST Exon4_R	ACATTTTCAGTTGCATACAGTTGTG	

2.3.9. Анализ метилирования в регионах делеции с помощью массового параллельного секвенирования и бисульфитной модификации

Бисульфитную конверсию ДНК проводили с помощью набора EZ DNA methylation Direct Kit (Zymo Research), согласно протоколу производителя. В результате бисульфитной модификации неметилированные цитозины в CpG-сайтах конвертировались в урацил, а затем в ходе ПЦР в тимин, а метилированные цитозины конвертации не подвергались.

Праймеры для амплификации конвертированной геномной ДНК были подобраны с использованием ресурса <http://www.urogene.org/methprimer/> в соответствии с рекомендациями по подбору праймеров для бисульфитного секвенирования [Li L.C., Dahiya R., 2002].

Для регионов X-сцепленной делеции Xq24 были подобраны участки, содержащие CpG-сайты (Рисунок 8).

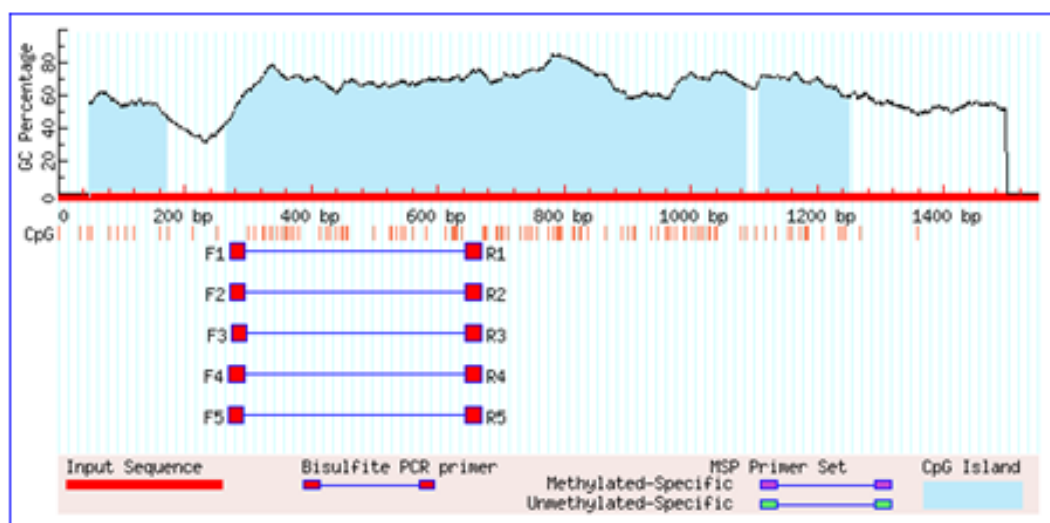


Рисунок 8 - Подбор праймеров с помощью программы MethPrimer на регион Xq24 (chrX:118707994-118709540)

Была определена оптимальная температура отжига (59,8 °C), и отобраны праймеры, наиболее подходящие по количеству CpG в продукте (Таблица 3).

Амплификацию ДНК проводили на C 1000TM Thermal Cycler BIO-RAD с использованием следующих реагентов и условий (Таблица 4).

Были получены ПЦР-продукты на регион Xq24 длиной 399 п.н. Результаты ПЦР идентифицировались с помощью 2,5% агарозного геле-электрофореза по стандартной методике.

Концентрации полученных продуктов измерялись с помощью системы Qubit (Thermo, США), согласно протоколу производителя.

Таблица 3 - Праймеры на участки делеции Xq24

Регион	Праймеры	Последовательность 5'---3'	Длина продукта	Кол-во CpG в продукте
Xq24	UBE2A_3 F	TGTTTTAGAATTAGTAGG TGGGGAT	399 п.н.	37
	UBE2A_3 R	TCAAAAATAAAACATAC ACTAAAATCTC		

Размер объединенной библиотеки оценивали с помощью прибора Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора Micro Kit v2 (300 циклов) в режиме парных прочтений с добавлением 30% PhiX.

Таблица 4 - Условия постановки ПЦР

смесь		условия	
17 мкл	10 мкл Микс HS-Тaq-полимераза	1. 95 °C 5 '	
	1 мкл праймера R	2. 40 циклов	2.1. 95 °C 30 "
	1 мкл праймера F		2.2. 59,8 °C 1 '
	5 мкл H ₂ O		2.3. 72 °C 1 '
3 мкл ДНК		3. 72 °C 7 '	
Общий объем 20 мкл		4. 4 °C 20 '	

Секвенированные последовательности были демультимплексированы стандартными баркодами Illumina i7 и i5 с использованием Genome Analysis Toolkit (GATK, v4.1.3.0) [McKenna A. et al., 2010]. Качество чтения оценивалось с использованием FastQC, а остаточные последовательности адаптера, а также чтения низкого качества удалялись с помощью Trimmomatic [Bolger A.M. et al., 2014]. Выравнивание прочтений было выполнено с использованием bwa-meth. Повторы генома человека маскировали с использованием последовательностей BEDTools [Quinlan A.R., Hall I.M., 2010] и RepeatMasker [Jurka J., 2000].

Индекс метилирования подсчитывали как отношение метилированного цитозина к общему числу метилированных и неметилированных цитозинов в каждом из анализируемых CpG-сайтов в %.

2.3.10. Используемые электронные ресурсы и базы данных

Для проведения анализа были привлечены данные из внешних общедоступных баз. Для интерпретации выявленных вариантов с помощью методов aCGH и NGS использованы следующие базы данных:

- DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans) - База данных хромосомных дисбалансов и патологий у человека <http://decipher.sanger.ac.uk/information>
- DGV (Database of Genomic Variants) - База данных геномных вариантов <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- ECARUCA (European Cytogenetics Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations) - Регистр несбалансированных хромосомных aberrаций Европейской цитогенетической ассоциации <http://www.ecaruca.net>
- PubMed - База данных медицинских и биологических публикаций, созданная Национальным центром биотехнологической информации (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Базы данных о частотах вариантов в популяции:

- dbSNP - База данных полиморфизма отдельных нуклеотидов
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
- Genome Aggregation Database (gnomAD) —
<https://gnomad.broadinstitute.org/>
- 1000 Genomes Project — <https://www.internationalgenome.org/>
- Great Middle East allele frequencies (GME) —
<http://igm.ucsd.edu/gme/>

Клиническая информация о генах:

- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®) —
<https://www.omim.org/>
- Orphanet — <https://www.orpha.net>
- GeneCards®: The Human Gene Database —
<https://www.genecards.org/>
- Human Phenotype Ontology (HPO) — <https://hpo.jax.org/app/>

Клиническая информация о вариантах генов:

- Human Gene Mutation Database (HGMD®) —
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
- ClinVar — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

2.3.11. Биоинформационные ресурсы и статистический анализ данных

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 обработанных бисульфитом прочтений с эталонным геномом; идентификация преобразованных и неконвертированных выровненных прочтений; деление количества метилированных прочтений (с цитозинами) на сумму прочтений (с цитозинами или тиминами). Для выполнения анализа результатов секвенирования первоначально 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).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ характера инактивации X-хромосомы

3.1.1 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 XCI была статистически значимо выше, чем у женщин без проблем с репродукцией. Эти отличия наблюдались в случаях инактивации X-хромосомы от 90% и более ($p=0,019$, Таблица 5).

Таблица 5 - Частота асимметричной X-инактивации в исследуемых выборках

Исследуемые группы	XCI $\leq$ 90%	XCI $\geq$ 90%	%	p
Женщины с невынашиванием беременности	292	21	6,7	0,019
Контрольная группа	132	3	2,2	

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 sXCI 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 ($p=0,26$, Таблица 6).

Таблица 6 - Частота асимметричной X-инактивации в исследуемых выборках

Исследуемые группы	XCI $\leq$ 89%	XCI $\geq$ 90%	%	p
Женщины с единичным случаем невынашивания	148	8	5,1	0,26
Женщины с привычным невынашиванием	144	13	8,2	

С целью исключения межтканевых различий, дополнительно статус XCI был проанализирован в 86 образцах ДНК из эндометрия матки от женщин с невынашиванием беременности. Эндометрий представляет собой сложную, многокомпонентную систему, состоящую из покровного и железистого эпителия, стромы, основного вещества и сосудов. Стволовые клетки костного мозга, из которых соответственно образуются лейкоциты периферической крови, происходят из мезодермы. С целью выяснить, можно ли объединить результаты исследования обеих тканей, полученные при анализе статуса XCI, с помощью теста Вилкоксона сравнили уровень XCI родительских хромосом в этих тканях у 86 женщин. Медиана (Q1, Q3) для XCI из крови составила 64% (56, 70), медиана (Q1, Q3) для XCI из эндометрия составила 64% (54, 69). При этом статистически значимых различий не было ($p=0,64$).

Информация о кариотипе спонтанных абортусов в группе женщин с невынашиванием беременности показала следующее распределение: у 207 женщин были СА с нормальным кариотипом (87 СА с 46,XX и 120 СА с 46,XY), у 64 женщин СА с анеуплоидным кариотипом, а у 42 женщин были СА с неизвестным кариотипом (кариотипирование не проводилось).

Нормальный кариотип СА был подтвержден для 54 СА с 46,XX (62%) и 81 СА с 46,XY (67,5%). Для остальных СА были доступны данные о кариотипировании, но дополнительной верификации не проводилось по причине отсутствия биоматериала. Частота sXCI в группе женщин со СА с нормальным кариотипом составила 6,2% (13 из 207) и была достоверно выше, чем у женщин (2,22%) без нарушений репродуктивной функции ($p=0,02$).

Так как X-сцепленные эмбриолетальные мутации у матери вероятнее всего приведут к гибели ее эмбриона мужского пола в случае наследования им мутантной X-хромосомы, то еще одним индикатором наличия таких мутаций у женщин с невынашиванием является соотношение полов (СП) как среди живорожденных детей, так и среди погибших эмбрионов. Соотношение полов – отношение числа особей мужского пола к числу особей женского пола является интегральным показателем, который отражает различия в жизнеспособности организмов разного пола. Многими авторами было показано, что соотношение полов у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом первого триместра беременности составляет около 0,8 с преобладанием эмбрионов женского пола [Hassold T. et al., 1980; Eiben B. et al., 1990, Orzack S.H. et al., 2015]

Однако, в настоящем исследовании соотношение полов СА при нормальном кариотипе I триместра беременности показало преобладание эмбрионов мужского пола (СП=1,5 (81/54)). Такое различие по сравнению с литературными данными можно объяснить предварительно проведенной верификацией кариотипа абортусов, что позволило исключить из исследования образцы с контаминацией материнскими клетками, которые давали ложный «женский» кариотип (Рисунок 3). Так, из изначально отобранных 152 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX у 36 спонтанных абортусов был идентифицирован ген *SRY*, а по результатам STR-анализа 26 локусов были исключены еще 22 спонтанных абортуса с различными анеуплоидиями, таким образом, было получено 94 верифицированных

абортуса с кариотипом 46,XX. Из отобранных 94 абортусов кровь матерей была доступна для 54 случаев (62%) для анализа статуса инактивации. Без проведенной верификации кариотипа, на основании только данных цитогенетического анализа, распределение соответствовало бы литературным данным с преобладанием эмбрионов женского кариотипа: 123 СА с 46,XX и 84 СА с 46,XY (СП=0,68). Если асимметричная инактивация происходит в результате отбора клеточного клона с летальной или условно летальной X-сцепленной мутацией, то гемизиготы по этой мутации, скорее всего, погибают в эмбриогенезе.

Также было проанализировано СП у спонтанных абортусов от женщин с равновероятной и асимметричной инактивацией X-хромосомы. В анализ были включены только верифицированные эмбрионы с нормальным кариотипом. Отличий в величине данного показателя между двумя группами выявлено не было. СП у спонтанных абортусов от 122 женщин с равновероятной инактивацией было равно 1,39 (71/51), при этом у 13 женщин с асимметричной ХСИ этот показатель был равен 3,33 (10/3) ($p=0,24$, двусторонний критерий Фишера).

3.1.2 Исследование статуса инактивации X-хромосомы у спонтанных абортусов

Для того чтобы провести семейный анализ характера sXCI, а также анализ сегрегации возможных патогенетически значимых CNV в парах «мать-спонтанный абортус» в рамках настоящего исследования мы выполнили анализ характера инактивации во внезародышевой мезодерме на расширенных выборках спонтанных абортусов I триместра беременности с кариотипом 46,XX и в группе контроля – медицинских абортусов I триместра от женщин, не пожелавших сохранить нормально протекавшую беременность.

Частота асимметричной инактивации одного из гомологов (90–100%) 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 ($p=0,04$, Таблица 7).

Таблица 7 - Частота асимметричной X-инактивации в исследуемых выборках

Исследуемые группы	XCI<90%	XCI≥90%	%	р, точный критерий Фишера
Спонтанные абортусы с кариотипом 46,XX	87	7	7,4	0,04
Индукцированные абортусы с кариотипом 46,XX	64	0	0	

Одним из возможных объяснений sXCI 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.

Для того чтобы подсчитать вероятности этих событий был проанализирован характер инактивации X-хромосомы в 54 парах «мать-спонтанный абортус». Информативными для анализа оказались только 46 пар, так как одна женщина с невынашиванием беременности и 8 спонтанных абортусов с кариотипом 46,XX оказались гомозиготными по исследованному участку гена AR. В этих парах не было ни одного случая, когда мать и ее абортус имели бы sXCI.

Однако, поскольку вероятность одновременного наличия sXCI и у матери, и у ее потомства крайне мала, для данного анализа порог степени инактивации X-хромосомы был снижен до 80% и более. Предположим, что у женщины-носительницы CNV произошла асимметричная X-инактивация мутантного гомолога. Своему потомству женщина может передать только два варианта X-хромосомы: без мутации (X_A) и с мутацией (X_a). Если такая женщина планирует беременность от здорового мужчины ($X_A Y$), то

распределение генотипов их детей будет следующим: девочка-носительница $X_A X_a$ (25%); здоровая девочка $X_A X_A$ (25%); больной мальчик $X_a Y$ (25%); здоровый мальчик $X_A Y$ (25%). В случае зачатия девочки-носительницы $X_A X_a$ инактивация X-хромосомы может быть трех вариантов: равновероятная инактивация (R), асимметричная инактивация мутантной X-хромосомы (M) и асимметричная инактивация X-хромосомы без мутации (N). Неизвестно, в какой степени вероятнее возникнет асимметричная инактивация, поэтому можно вывести формулу вариантов инактивации X-хромосомы у дочери-носительницы как $R+M+N=1$, где R - равновероятная инактивация, M - асимметричная инактивация мутантной X-хромосомы, N - асимметричная инактивация X-хромосомы без мутации, $1=100\%$.

Используя собственные эмпирические данные, можно рассчитать вероятность зачатия девочки-носительницы $X_A X_a$ с sXCI.

Обнаружено, что почти во всех случаях, когда у женщины была равновероятная XCI, у ее СА также была равновероятная XCI (32 из 33 случаев (96,9%)). То есть, $R=0,969$; $M+N=0,031$. Однако одновременная XCI от 80% и у женщины, и у ее СА была выявлена в 38% случаев (5 из 13 случаев (38,5%)). То есть для женщин с sXCI вероятность зачатия дочери с sXCI выше, чем для женщин с равновероятной инактивацией: $R=0,615$; $M+N=0,385$.

Таким образом, вероятность того, что нормальная X-хромосома может быть инактивирована у погибшего эмбриона, все же высока, но не исключено, что нами обнаружены семейные случаи асимметричной X-инактивации, не связанные с эмбриональной летальностью.

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

Одной из причин формирования первичной асимметричной инактивации X-хромосомы могут быть мутации в гене *XIST* [Viggiano E. et al., 2016]. Также, у так называемых эмбрионов низкого качества (poor-quality embryos)

женского пола, полученных в результате процедуры ЭКО, с асимметричной X-инактивацией была обнаружена потеря гетерозиготности (LOH) на протяженных участках X-хромосомы, захватывающих либо ген *XIST*, либо *XACT* [Luo Y. et al., 2014]. Ген *XACT* кодирует длинную нкРНК, покрывающую активную X-хромосому у человека, которая, как считается, играет роль в контроле инактивации X-хромосомы (XCI) [Vallot C. et al., 2013].

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 Xi [Brown C. J., Willard H. F., 1994], но влияние потери *XIST* на хроматин Xi мало изучено. С помощью генной инженерии была создана женская клеточная линия с делециями локусов *XIST*, полученная от пациента с хроническим миелогенным лейкозом [Lee H. J. et al., 2019]. С помощью этого исследования была показана важная роль экзона 5 в поддержании инактивации. Кроме того, было показано, что экзон 6 важен для поддержания конденсации облака *XIST*. Недавнее исследование 2021 года также базировалось на создании линий клеток с делецией промотора *XIST* с помощью генной инженерии, но уже в соматических клетках, а не от пациентов с онкологическим заболеванием. Были отмечены признаки нестабильности хроматина, однако, заметных изменений в реактивации генов из неактивной хромосомы выявлено не было [Westervelt N. et al. 2021].

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

Анализ результатов секвенирования генов *XIST* и *XACT* проводили с использованием баз данных dbSNP (avsnp150) и HGVS. Всего для гена *XIST*

было идентифицировано 107 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), из которых 33 SNP находились в экзонах и 74 SNP в интронах (приложение А, Таблица А.1).

Из выявленных SNP 64 оказались в гетерозиготном состоянии, а 30 из этих 64 были эталонными SNP (rs или RefSNP), то есть сгруппированы и аннотированы в dbSNP (с указанием имеющихся публикаций, аллелей и частот). Эти варианты довольно распространены в популяции (более 1%) и не являются специфическими. Кроме того, ранее не было показано корреляции между степенью sXCI и генотипами по 5 полиморфным локусам в пределах гена *XIST*, среди которых в нашей выборке были идентифицированы rs1894271 и rs1009948 [Bolduc V. et al., 2007].

Проанализированы популяционные частоты SNP в генах *XIST* и *XACT* в 76 этнических и субэтнических группах, полученные методом микрочипового анализа геномов с использованием «Infinium Multi-Ethnic Global-8 Kit» (всего 1860 человек). Таким образом, исключены варианты rs7879153, rs1009948, rs147403925, rs776820848, rs370531267, rs782614447 и rs16992442 в гене *XIST*, обнаруженные в российской популяции. Кроме того, исключены варианты с популяционной частотой более 5%, оставив таким образом 21 SNP в гене *XIST*.

Для гена *XACT* было идентифицировано всего 15 SNP, из которых 14 были локализованы в интронах и только 1 в экзоне (rs10690888) (Таблица 8). Из идентифицированных SNP 8 оказались гетерозиготными, из них 6 RefSNP. Проведенный анализ баз данных не позволил однозначно предположить наличие у этих женщин патогенетически значимых вариантов в гене *XACT*, влияющих на смещение инактивации X-хромосомы.

Таким образом, у 21 женщины была исключена первичная асимметричная инактивация X-хромосомы, что позволило сконцентрироваться на дальнейшем поиске CNV в этой группе пациенток.

Таблица 8 - Спектр SNP в гене *XACT*

ген	SNP	генотип	частота в популяции
<i>XACT</i>	rs12837611	chrX:113616748A>G	0,01
<i>XACT</i>	rs781993804	chrX:113617010AAC>A	1,85E-05
<i>XACT</i>	.	chrX:113617210G>C	.
<i>XACT</i>	.	chrX:113617211G>A	.
<i>XACT</i>	.	chrX:113617213G>A	1,84E-05
<i>XACT</i>	rs182991814	chrX:113617681T>C	0,0013
<i>XACT</i>	rs5929162	chrX:113616800T>A	0,4347
<i>XACT</i>	rs2207299	chrX:113617181A>G	0,4103
<i>XACT</i>	rs10669933	chrX:113617845TAA>T	0,4107
<i>XACT</i>	rs10690888	chrX:113618125TTC>T	0,3468
<i>XACT</i>	rs56023676	chrX:113617237G>A	0,8948
<i>XACT</i>	rs56411754	chrX:113617352G>A	0,8952
<i>XACT</i>	rs73636120	chrX:113617776A>G	0,8949
<i>XACT</i>	rs201990370	chrX:113617821C>CGTT	0,9003
<i>XACT</i>	rs370531267	chrX:113617825A>G	0,8949

3.3. 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 9). 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).

Перекрывающиеся dupXp22.33 были выявлены у трех женщин (2 женщины с НБ и женщина из группы контроля) и имели размер от 26 kb до 1,7 Mb. Обе женщины с невынашиванием беременности имели еще и дупликации в регионе Xq28. У одной женщины с НБ была выявлена дупликация Xp22.33 размером 1,7 Mb. В дупликации задействованы гены *PLCXD1*, *GTPBP6*, *LINC00685*, *PPP2R3B*, *SHOX*, *CRLF2*, *CSF2RA*, *MIR3690*, *MIR3690-2*, *IL3RA*, *SLC25A6*, *ASMTL-AS1*, *ASMTL*, *P2RY8*, *AKAP17A*, *ASMT2*. У другой женщины с НБ в дупликации Xp22.33 участвовали гены *PLCXD1*, *GTPBP6*, *LINC00685*, *PPP2R3B*, *SHOX*, а у женщины из группы контроля один ген *SHOX*. Общим геном для всех трех дупликаций был ген *SHOX* (Рисунок 9).

Для выявления CNV в регионе Xp22.33 ПЦР в реальном времени является неинформативной, поэтому была осуществлена их верификация с помощью мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA).

Проведена MLPA с образцами ДНК всех женщин с dupXp22.33, а также контрольных образцов ДНК без дупликаций в регионе Xp22.33. В результате не было выявлено значимого повышения высоты пиков (более 1,3 раза) в 184, 238, 337, 481 (зонды на ген *SHOX*) всех образцов, а также для пиков 250, 283, 391 (ген *CRLF2*) в образце ДНК пациентки с дупликацией Xp22.33 размером 1,7 Mb. В результате были исключены дупликации в регионе Xp22.33.

Для подтверждения остальных CNV использовалась количественная ПЦР в режиме реального времени. Таким образом, нами были обнаружены и подтверждены микродупликации в регионе Xp28 и микроделеции в регионах Xp11.23 и Xq24.

Таблица 9 - Спектр CNV у женщин с sXCI

Код семьи	Возраст женщины	Анамнез	XCI в крови (%)	aCGH, (ISCN 2020)	Размер	Кариотип абортуса	XCI (%) в мезодерме	X-сцепленная CNV у абортуса
PLG1	26	2 неразвивающихся 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 неразвившивающи хся беременностей, 1 медицинский аборт	100	arr[GRCh37] Xq24 (118555586_118794279)×1	239 kb	46,XX	70	материнского происхождения
						46,XY	0	материнского происхождения
						46,XY	0	материнского происхождения
PLG3	32	2 неразвившивающи хся 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	0	материнского происхождения

Продолжение Таблицы 9 - Спектр CNV у женщин с sXCI

Код семьи	Возраст женщины	Анамнез	XCI в крови (%)	aCGH, (ISCN 2020)	Размер	Кариотип абортуса	XCI (%) в мезодерме	X-сцепленная CNV у абортуса
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	-	-	-

Примечание: PLG (pregnancy loss group) – женщины с невынашиванием, CG (control group) – женщины без проблем с репродукцией

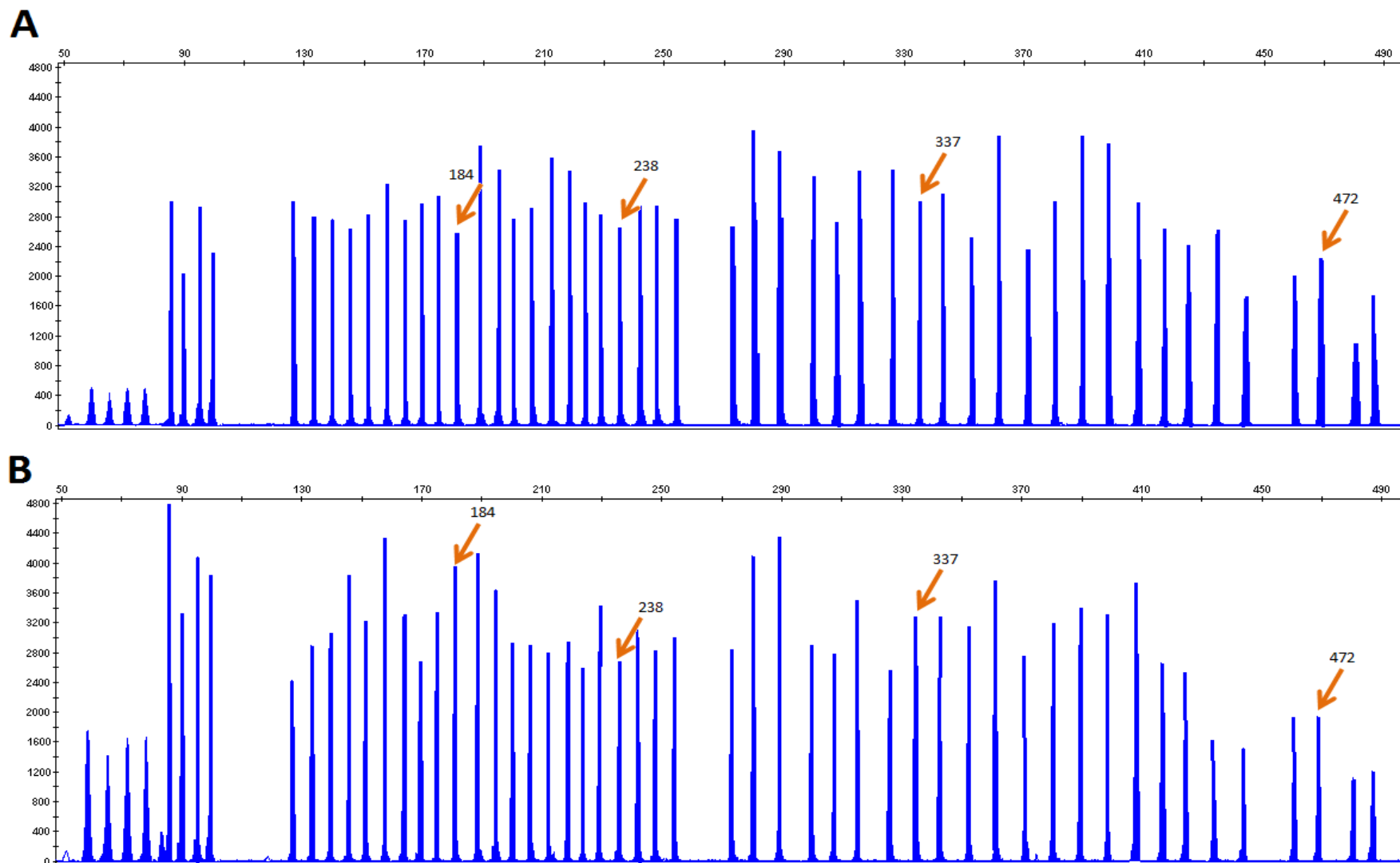


Рисунок 9 - Результат MLPA с зондами на ген *SHOX*. А – контрольный образец, В – женщина с невынашиванием беременности

Амплификации области Xq28 были обнаружены у пяти женщин: у 2 женщин имелась дупликация, затрагивающая ген *GDI1* (Таблица 9, женщины PLG5, CG2); 2 женщины (Таблица 9, женщины PLG3 и PLG4) имели дупликацию, затрагивающую гены *SPRY*, *VAMP7*, *IL9R*; и у одной женщины (Таблица 9, женщина PLG6) была дупликация, затрагивающая *VBP1*, *RAB39B*, *CLIC2*, *TMLHE-AS1*, *H2AFB2*, *H2AFB3*, *H2AFB1*, *F8A1*, *F8A3*, *F8A2*, *MIR1184-3*, *MIR1184-2*, *MIR1184-1*, *SPRY*, *VAMP7* и *IL9R*.

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 литературных источников.

Проведен анализ обогащения генов в регионах выявленных X-сцепленных CNV (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/enrich>) и выявлено, что наиболее представленной является группа генов, мутации в которых являются причиной умственной отсталости (Таблица 10).

Таблица 10 - 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>L1CAM</i> (OMIM#308840) <i>CLIC2</i> (OMIM #300138) <i>CXorf56</i> (OMIM#301013) <i>GDI1</i> (OMIM #300815)

3.4. Анализ патогенетически значимых CNV в контрольной выборке женщин без проблем с репродукцией

Для интерпретации частоты, клинической значимости и патогенности выявленных микроструктурных перестроек были использованы базы данных из открытого доступа (DECIPHER; DGV; ECARUCA; PubMed) и собственные данные НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, полученные в результате научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства». В анализ вошли данные 450 человек, полученные в результате микрочипового анализа геномов с использованием «Infinium Multi-Ethnic Global-8 Kit. Были представлены следующие этно-территориальные группы населения России и Средней Азии: абхазы, аварцы, агулы, адыги, азербайджанцы, андийцы, арчинцы, ахвахцы, багулалы, барабинские татары, башкиры, бежтинцы, ботлихцы, буряты, гагаузы, генухцы, гунзибцы, даргинцы, дидойцы (цезы), ингуши, казанские татары, караногайцы, каратинцы, карачаевцы, кумыки, лакцы, лезгины, марийцы, мегрелы, молдаване, мордва, нахадинцы, ненцы, томские татары, осетины, поляки, русские томской области, рутульцы, табасараны, тиндинцы, томские татары, удмурты, украинцы, хакасы, ханты, хваршины, цахуры, чамалинцы, чеченцы, чуваша, чулымские тюрки, южные алтайцы. 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 пересекающей микроструктурной перестройки, что свидетельствует в пользу вероятной патогенности выявленных CNV для невынашивания беременности.

Выявленные дупликации в регионе Xq28 и делеция в регионе Xq24 (Xq24 (117509030_117545557)×1)) встречались у женщин из контрольной группы, не имеющих проблем с репродукцией. Однако, делеция Xq24 (118555586_118794279)×1 у женщины PLG2 выявлена только у женщины с

ПНБ, поэтому проведено исключение возможного носительства делеции 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.

3.5. Сегрегационный анализ X-сцепленных CNV

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.

3.5.1 Дубликации в регионе Xq28

Самая протяженная дубликация на X-хромосоме - arr[GRCh37] Xq28 (154450164_155232907)×3 размером 783 т.п.н. была выявлена у 25-летней женщины **PLG6** с единственным выкидышем с кариотипом 46,XX (Рисунок 10). В область дубликации вошли гены *VBP1*, *RAB39B*, *CLIC2*, *TMLHE-AS1*, *H2AFB2*, *H2AFB3*, *H2AFB1*, *F8A1*, *F8A3*, *F8A2*, *MIR1184-3*, *MIR1184-2*, *MIR1184-1*, *SPRY*, *VAMP7*, *IL9R*. Выявленная дубликация затрагивает область, которая входит в регион редкого синдрома «Xq28 Duplication Syndrome, Int22h1/Int22h2 Mediated Syndrome». Во всем мире описано 35 случаев этой дубликации с различными типами X-сцепленных форм умственной отсталости в зависимости от генов, участвующих в дубликации [El-Hattab et al., 1993; Ballout et al., 2020]. Более того, 3 из 35 случаев были

диагностированы пренатально из-за проблем с репродукцией у их матерей. Но в данных работах нет данных о статусе X-инактивации, что не исключает возможности асимметричной инактивации X у этих пациентов.

Кроме того, у женщин **PLG3** и **PLG4** (Рисунок 11) выявлена пересекающаяся дупликация $\text{arr}[\text{GRCh37}] \text{ Xq28}(154976684_155232907) \times 3$ размером 256 kb, в которую вошли гены *SPRY*, *VAMP7*, *IL9R*. По данным DECIPHER, таких CNV (размером до 300 кб) зафиксировано 23 случая. В большинстве случаев у пациентов указана или задержка речевого и языкового развития или умственная отсталость, но нет данных о проблемах с беременностью у женщин-носительниц.

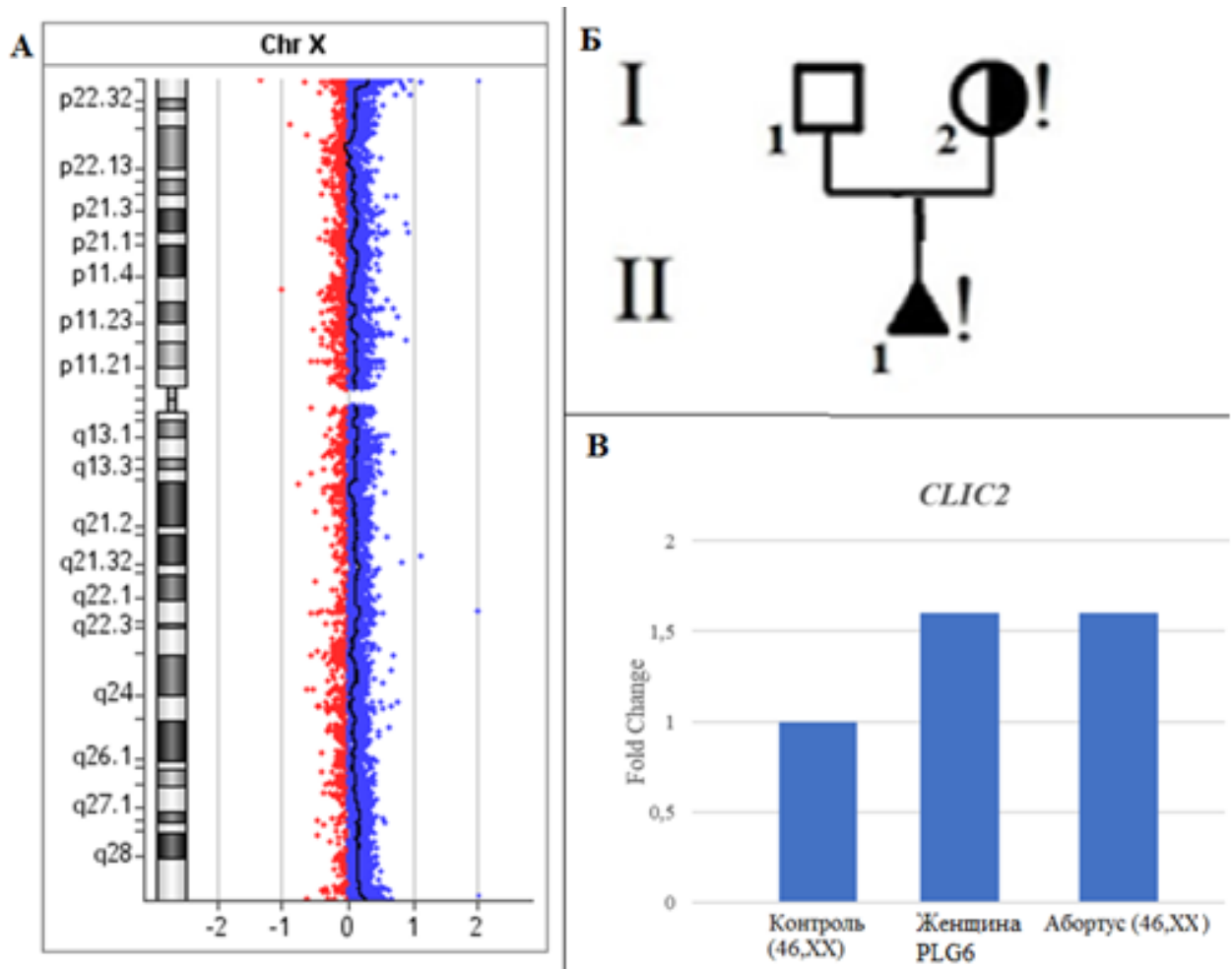


Рисунок 10 - Микродупликация Xq28 в семье PLG6.

А – результат агау-CGH, Б – родословная женщины PLG6, В – результат ПЦР в режиме реального времени

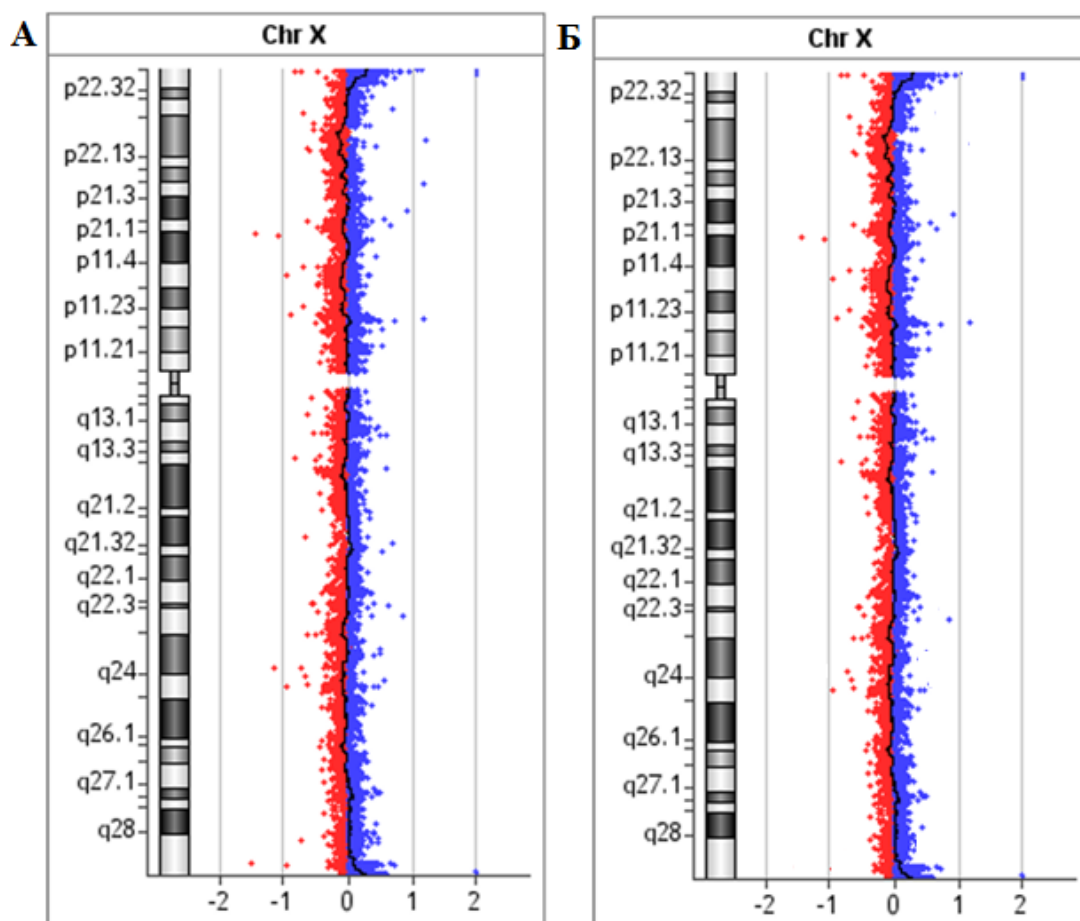


Рисунок 11 - Микродупликация Xq28 в семьях PLG3 и PLG4.
 А - результат array-CGH для женщины PLG3, Б - результат array-CGH для женщины PLG4

Продукт гена *VBP1* взаимодействует с белком Гиппеля-Линдау с образованием внутриклеточного комплекса. Белок *VBP1* имеет функцию шаперона и может играть определенную роль в транспортировке белка Гиппеля-Линдау из перинуклеарных гранул в ядро или цитоплазму. Белок Гиппеля-Линдау – супрессор опухолевого роста. При его недостатке наблюдается безудержный опухолевый рост в разных локализациях [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>]. Мутации в генах *RAB39B* (OMIM#300774) и *CLIC2* (OMIM #300138) связаны с X-сцепленными формами умственной отсталости. Гены *H2AFB2*, *H2AFB3*, *H2AFB1* кодируют независимый от репликации гистон, который является членом семейства гистонов H2A [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>]. Эти гены являются частью области, которая повторяется три раза на X-хромосоме, один раз в интроне

22 гена F8 и два раза ближе к теломере длинного плеча. Функции небольших генов *F8A1*, *F8A3*, *F8A2* неизвестны.

В область дупликации вошли три гена, кодирующие микроРНК - *MIR1184-3*, *MIR1184-2*, *MIR1184-1*. Ген *VAMP7* кодирует трансмембранный белок, который является членом семейства растворимых N-этилмалеимид-рецепторов (SNARE). Этот белок локализуется в поздних эндосомах и лизосомах и участвует в слиянии транспортных везикул с их целевыми мембранами [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>]. Белок, кодируемый геном *IL9R*, представляет собой рецептор цитокинов, который специфически опосредует биологические эффекты интерлейкина 9 (IL9). Этот белок входит в функциональный рецепторный комплекс IL9 вместе с рецептором интерлейкина-2-гамма (IL2RG), общим для рецепторов многих цитокинов. Связывание лиганда с этим рецептором приводит к активации сигнального пути JAK/STAT, который является одним из консервативных путей регуляции у высших эукариот, и играет важную роль в различных процессах онтогенеза. Этот ген расположен в псевдоаутосомных областях X и Y-хромосом.

El-Hattab A.W. и др. сообщили о 4 мальчиках из трех семей, в том числе 2 братьях, с умственной отсталостью и поведенческими расстройствами, связанными с повторяющейся дупликацией хромосомы Xq28 размером примерно 0,5 Mb, идентифицированной с помощью arrayCGH [El-Hattab A.W. et al., 2011]. Дупликации затрагивали регион chrX: 153.7- 154.2 Mb (NCBI36 / hg19), и были подтверждены с помощью FISH с использованием специальных зондов для определения лайонизации. Все 3 матери из этих семей также имели дупликацию в этом регионе и асимметричную инактивацию X, но у двух женщин наблюдалась преимущественная инактивация нормальной X-хромосомы, а у одной инактивация X-хромосомы с дупликацией Xq28. Анализ последовательности ДНК показал, что точки разрыва происходят в пределах низкокопийных повторов (LCR), локализованных в областях int22h-1 и int22h-2, которые находятся в гене *F8*

или близко к нему (300841). Область дупликации содержала 9 генов, включая *RAB39B* (300774). Все 4 мальчика с дупликацией имели когнитивные нарушения, агрессивное и / или гиперактивное поведение, рецидивирующие ушные инфекции или пневмонию и умеренно дисморфические черты лица, включая высокий лоб, полноту верхнего века, широкую переносицу и толстую нижнюю губу. Кроме того, те же авторы сообщили о семье, в которой мать и дочь несут гетерозиготную реципрокную делецию Xq28 со 100% асимметричной инактивацией мутантной X-хромосомы. У них не было умственной отсталости, но дочь привлекла внимание из-за гиперактивности, невнимательности и трудностей сенсорной интеграции. В анамнезе матери было 2 самопроизвольных аборта и это может указывать на то, что делеция летальна для плодов мужского пола. Пересекающаяся делеция, захватывающая регион гена *F8*, связанная с sXCI и самопроизвольными абортами, была описана ранее Pergeraro с соавторами в большой семье, состоящей из 50 человек [Pergeraro E. et al., 1997].

У двух женщин – одна из группы женщин с невынашиванием (женщина **PLG5**), а вторая из группы контроля (женщина **CG2**) была обнаружена одна и та же моногенная дупликация arr[GRCh37] Xq28 (153666039_153666485)×3 размером 447 т.п.н (Рисунок 12, 13). В нее вошел ген *GDI1*. Дупликация гена *GDI1* также была обнаружена у СА с кариотипом 46,XY от женщины **PLG5** (Рисунок 12).

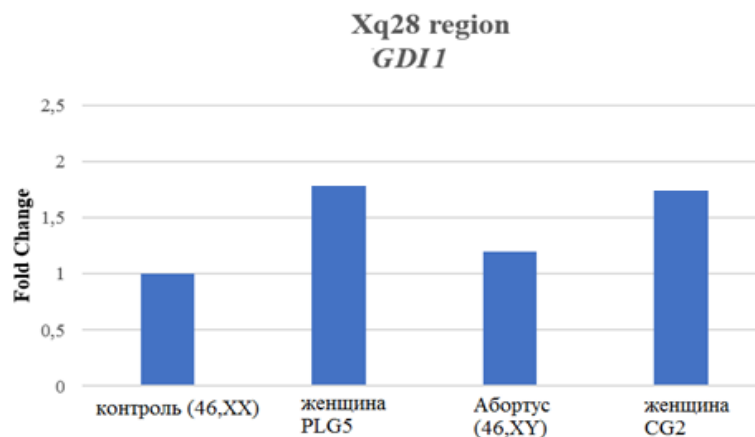


Рисунок 12 - Подтверждение микродупликации Xq28 в семьях CG2 и PLG5 с помощью ПЦР в режиме реального времени (ген *GDI1*)

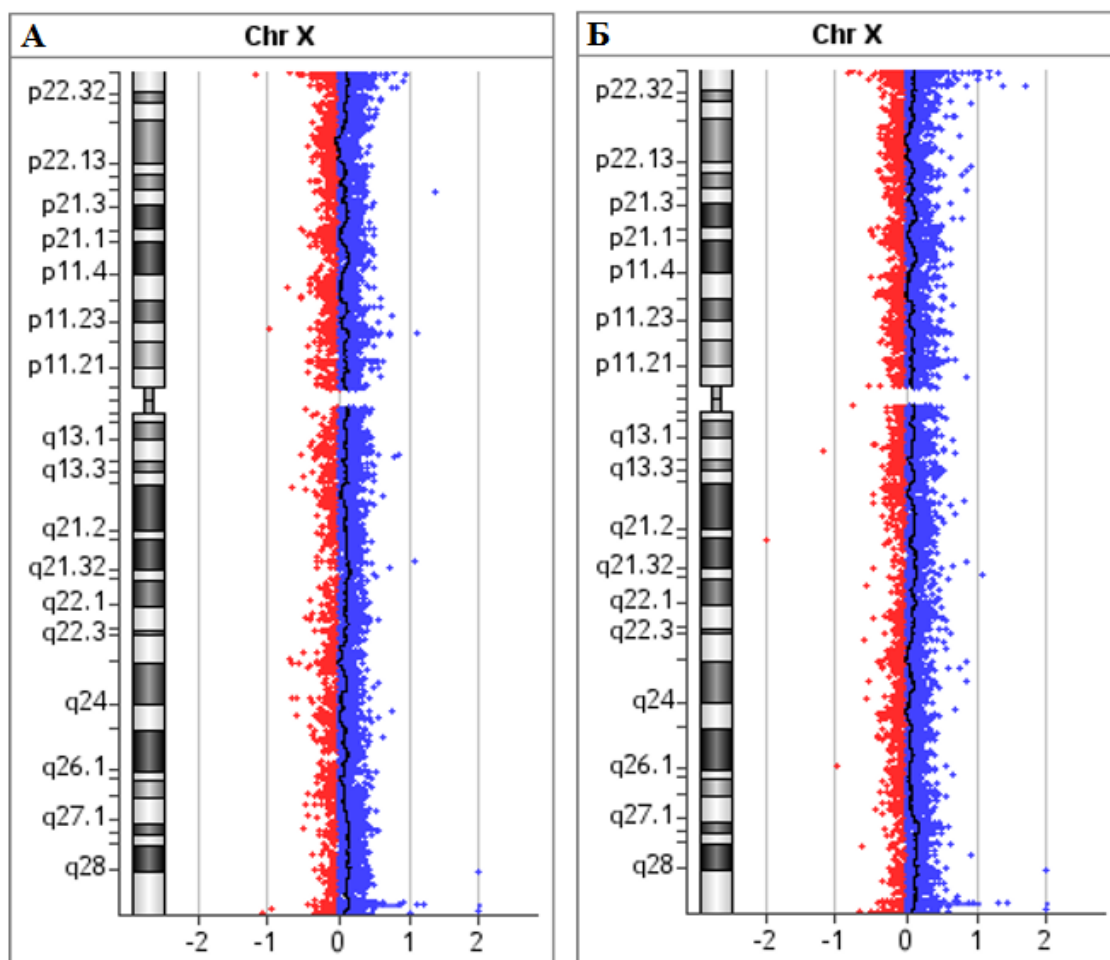


Рисунок 13 - Микроудупликация Xq28 в семьях CG2 и PLG5.

А – результат агау-СН для женщины CG2, Б - результат агау-СН для женщины PLG5

Ген в основном экспрессируется в нервных и сенсорных клетках и его продукт относится к ингибиторам диссоциации ГДФ, которые регулируют обмен ГДФ-ГТФ членов семейства *gab*, небольших мономерных ГТФ-связывающих белков (mG-белков). Увеличение дозы гена *GDI1* вследствие дупликаций, трипликаций, а также амплификаций связано с X-сцепленной формой когнитивного расстройства у мужчин (OMIM #300815). Примечательно, что количество копий *GDI1* полностью коррелирует с тяжестью заболевания, которое варьирует от умеренной несиндромальной умственной отсталости у пациентов с дупликацией *GDI1* до тяжелой формы с эпилепсией и аномалиями мозга у пациентов с пятью копиями гена. У

женщин-носительниц этой хромосомной aberrации наблюдается sXCI 85-100% [Vandewalle J. et al., 2009].

3.5.2. Делеции на X-хромосоме

У женщины из группы контроля (женщина **CG1**) была выявлена микроделеция arr[GRCh37] Xq24 (117509030_117545557)×1, захватывающая гены *WDR44*, *MIR1277* (Рисунок 14). Согласно DECIPHER, не зарегистрировано подобных CNV, затрагивающих только гены *WDR44* и *MIR1277*.

Эта CNV была выявлена у женщины из контрольной группы без проблем с репродукцией, в то время как в литературе подобные CNV также не встречались. Учитывая эти данные, патогенность этой мутации сомнительна, и этот CNV может быть не связан с нарушением репродуктивной функции.

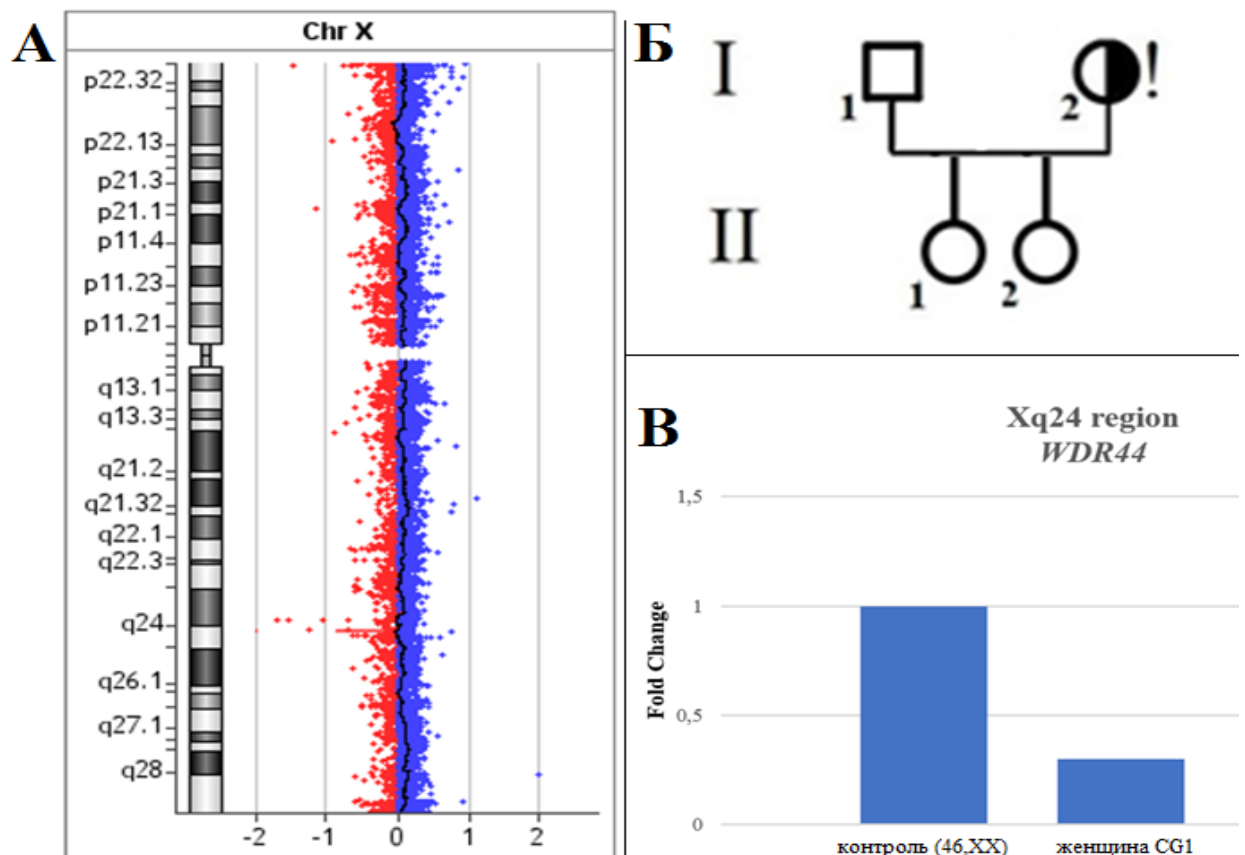


Рисунок 14 - Микроделеция Xq24 в семье CG1.

А- результат array-CGH, Б- родословная женщины CG1, В – результат ПЦР в режиме реального времени.

Продукт гена *WDR44* взаимодействует с *gab*-белками - небольшими мономерными ГТФ-связывающими белками (mG-белки) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>]. О функциях этого гена у человека мало известно, но показано, что продукт этого гена необходим в эмбриогенезе у червя *Caenorhabditis elegans*. У *C. elegans* наружный слой эпителиальных клеток, называемый эпидермисом, формируется на поверхности эмбриона на раннем этапе развития. Вскоре после этого эмбриональный эпидермис испытывает мощные сокращения вдоль поверхности эмбриона. Сила, создаваемая этими сокращениями, преобразует зародыш из овальной в приблизительно цилиндрическую форму. Эти сокращения также сдавливают внутренние ткани и органы, которые соответственно удлиняются вместе с эпидермисом. Известно, что такие «механические» силы важны для нормального развития эмбрионов. Устойчивость эпидермиса к этой силе и окружающим силам сжатия на основе актомиозина опосредуется FBN-1, белком домена ZP, связанным с фибриллинами позвоночных. FBN-1 экспрессируется в эпидермальных клетках и секретируется на апикальную поверхность в качестве предполагаемого компонента эмбриональной оболочки. Процессинг мРНК *fbn-1* требует консервативного альтернативного фактора сплайсинга MEC-8/RBPMS, а консервативные белки SYM-3/FAM102A и SYM-4/WDR44, которые связаны с переносом белка, функционируют как дополнительные компоненты этой сети. Каким образом может влиять ген *WDR44* на эмбриогенез человека не ясно, но показано, что белковый продукт этого гена имеет высокий уровень экспрессии в плаценте [<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131725-WDR44/tissue>]. Продукт гена *MIR1277*- *miR1277* является негативным регулятором LncRNA CRNDE, который может подавлять пролиферацию, миграцию и инвазию клеток трофобласта [Zhu H., Kong L., 2019]. У этой женщины с sXCI имеются две дочери, но они не доступны для обследования, в связи с чем она была исключена из сегрегационного анализа.

У 26-летней женщины **PLG1**, имеющей в анамнезе две неразвивающиеся беременности, была обнаружена делеция в регионе Xp11.23 размером 52 т.п.н. (Рисунок 15). Делеция была моногенной, в ней участвовал ген *ZNF630*. Делеция была выявлена и у ее СА женского пола с равновероятной инактивацией. Ген *ZNF630* является членом специфического для приматов кластера генов цинковых пальцев, локализованного в регионе Xp11, который состоит из шести близко родственных генов, мутации в трех из них - *ZNF41*, *ZNF81* и *ZNF674*, как было показано, участвуют в формировании умственной отсталости [Lugtenberg D. et al., 2010].

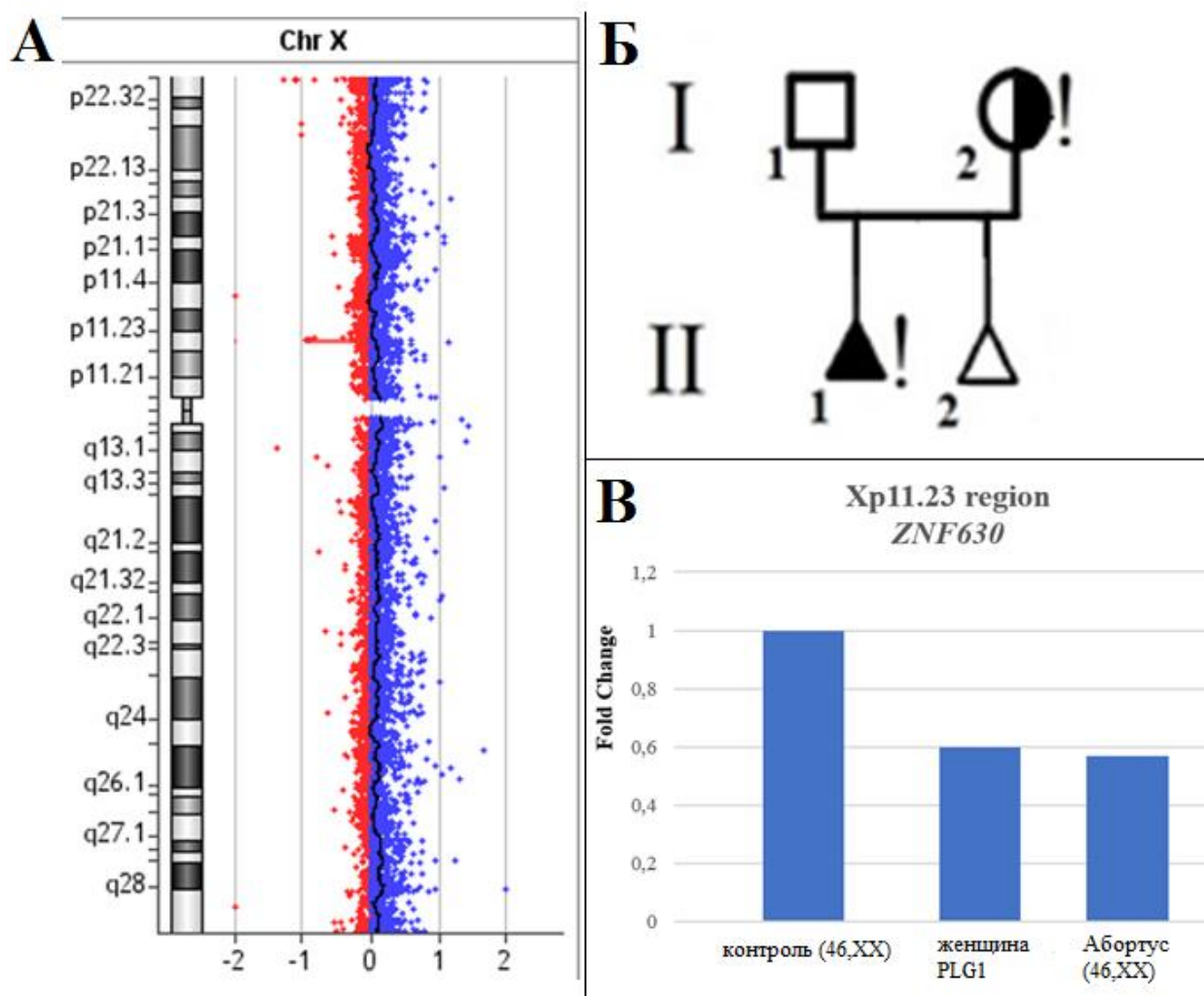


Рисунок 15 - Микроделеция Xp11.23 в семье PLG1.

А- результат агау-СН, Б- родословная женщины PLG1, В – результат ПЦР в режиме реального времени

До сих пор не ясно, являются ли мутации в гене *ZNF630* причиной формирования интеллектуальных расстройств и невынашивания беременности. Делеция гена *ZNF630* была выявлена у 12 из 1562 мужчин с умственной отсталостью и у 10 из 2121 здоровых мужчин, что статистически незначимо ($p=0,174$). По данным DECIPHER, зафиксирован только 1 случай такой CNV неясного клинического значения у женщин (размер 209,54 кб), унаследованный от нормального родителя. Но среди мужчин подобных CNV было 5 случаев (размеры 29,58 т.п.н., 51,56 т.п.н.), при этом умственная отсталость зарегистрирована в 3 из 5 случаев.

У женщины **PLG2** была обнаружена делеция в регионе Xq24 размером 239 т.п.н., затрагивающая 8 генов: *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5*, *CXorf56*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPT6*, *MIR766* (Рисунок 16).

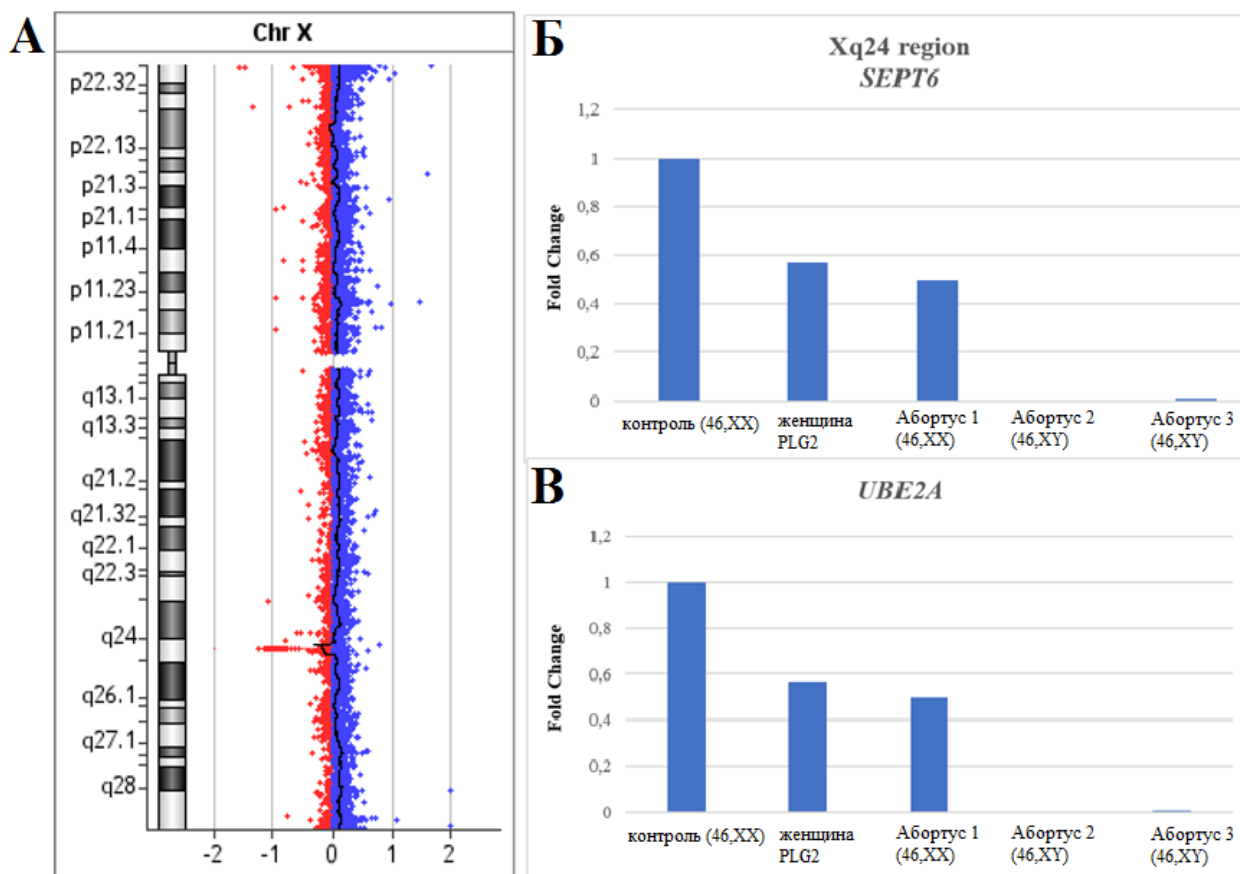


Рисунок 16 - Микроделеция Xq24 в семье PLG2.

А – результат arraу-CGH, Б – результат ПЦР в режиме реального времени (ген *SEPT6*), В – результат ПЦР в режиме реального времени (ген *UBE2A*)

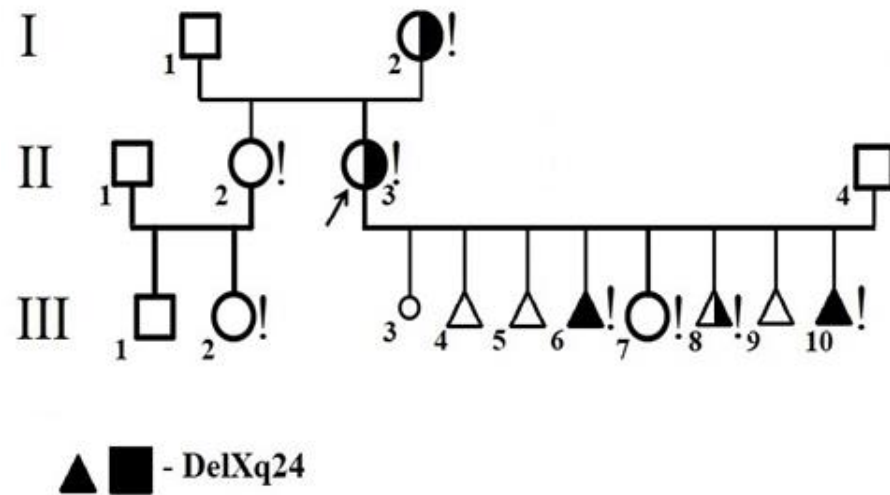


Рисунок 17 - Родословная женщины PLG2

В лимфоцитах периферической крови пациентки была отмечена асимметричная XCI (100%), в буккальном эпителии (95%) и в эндометрии (98%). К возрасту 29 лет у нее было 8 самостоятельно наступивших беременностей в одном браке, из которых первая закончилась медицинским прерыванием беременности по желанию женщины, 4 неразвивающихся беременности, 2 самопроизвольных выкидыша на ранних сроках (5-7 недель) и одни роды – девочка, роды в срок, оперативные. Беременность протекала с угрозой прерывания, из-за истмико-цервикальной недостаточности в 20 недель беременности на шейку матки были наложены швы. Проведен молекулярно-генетический анализ в регионе Xq24 с помощью ПЦР в режиме реального времени у трех спонтанных абортусов (Рисунок 17, III-6 и III-10: кариотип 46,XY, III-6 с кариотипом 46,XX), дочери (Рисунок 17, III-7) и матери пациентки (Рисунок 17, I-1). У всех спонтанных абортусов и матери пациентки была обнаружена микроделеция Xq24, тогда как у здоровой дочери (III-7) такой микроделеции не наблюдалось. У спонтанного абортуса с кариотипом 46,XX выявлена равновероятная X-инактивация (50/50%). У дочери пациентки отмечена равновероятная X-инактивация (50/50%) как в лейкоцитах периферической крови, так и в буккальном эпителии, тогда как у матери пациентки sXCI составило 100% в лейкоцитах периферической крови. Кроме того, у сестры женщины **PLG2** (Рисунок 17, II-2) не выявлено делеции

Xq24. ХСІ в лейкоцитах периферической крови у нее не значительно отклонялась от равновероятной (70/30%) У сестры имеются два здоровых ребенка: мальчик и девочка. Таким образом, носительство микроделеции Xq24 в данной семье сопровождалось асимметричным смещением X-инактивации как минимум в двух поколениях.

Анализ делеции в регионе Xq24 у женщины PLG2 показал, что делеция 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 18) [Nascimento R.M.P. et al., 2006; Budny B. et al., 2010; De Leeuw N. et al., 2010; Honda S. et al., 2010; Czeschik J.C. et al., 2013; Haddad D.M. et al., 2013, Tucker T. et al., 2013, Thunstrom S. et al., 2015; Tsurusaki Y. et al., 2017; Tolmacheva E.N. et al., 2020].

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]. Ген *UBE2A* действует как E2 убиквитин-связывающий белок, который в комбинации с E3-убиквитин-лигазой, такой как паркин, уничтожает митохондриальные белки, чтобы облегчить гибель дисфункциональных митохондрий в клетках [Haddad D.M. et al., 2013]. 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].

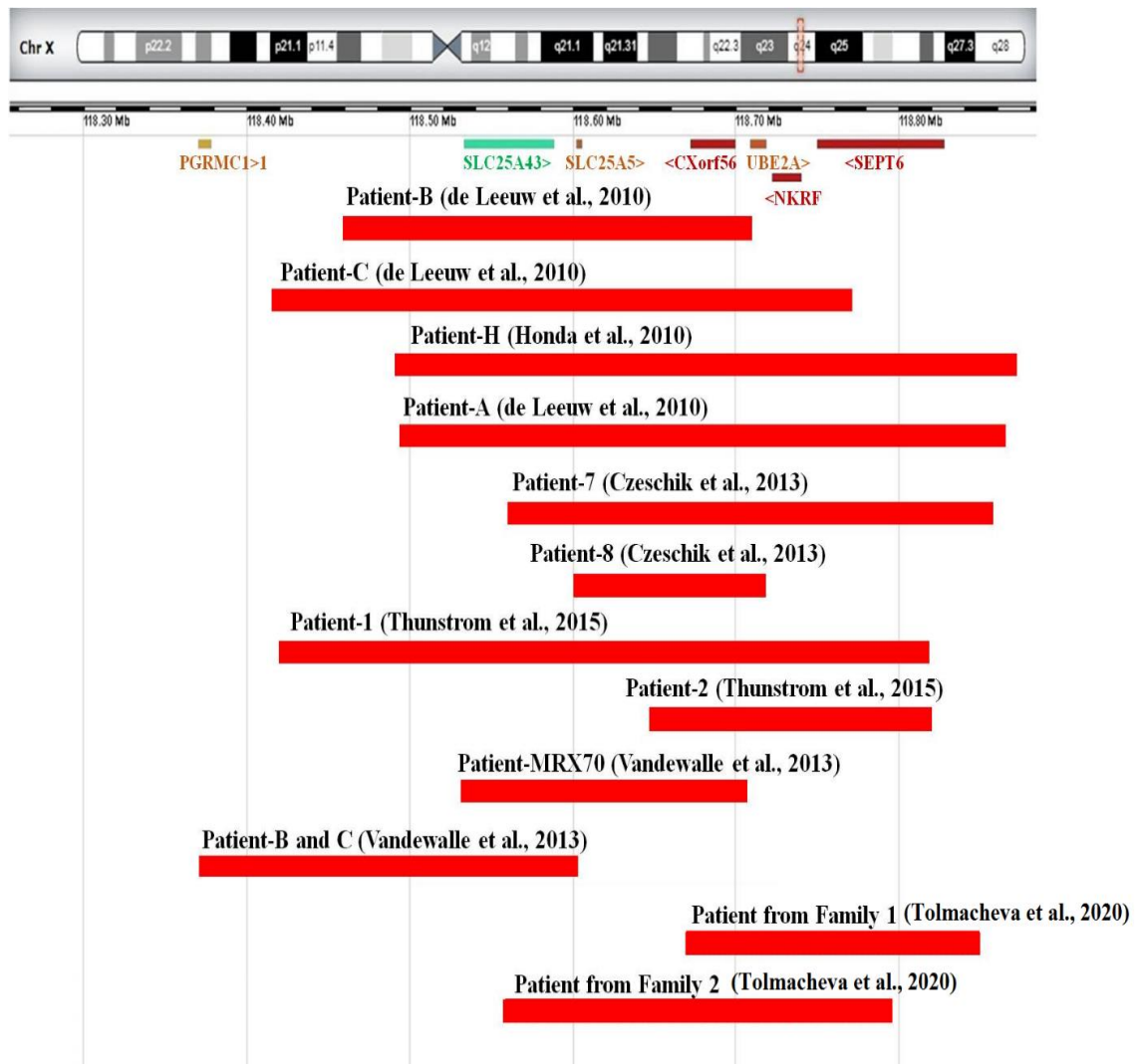


Рисунок 18 - Спектр делеций в Xq24

При анализе генотип-фенотипических корреляций всех пациентов с синдромом дефицита UBE2A можно разделить на две основные группы. (I) группа из тех, у кого есть внутригенные мутации (либо точечные мутации, либо небольшие делеции), и (II) группа пациентов, имеющих большие делеции, включающие другие гены в дополнение к *UBE2A*. Пациенты с более крупными делециями, включающими ген *UBE2A*, имели большую частоту пороков белого вещества головного мозга и пороков развития мочеполовой системы по сравнению с пациентами с внутригенными делециями и миссенс-мутациями. Более того, пороки сердца также чаще встречались у пациентов из второй группы по сравнению с пациентами первой [Thunstrom S. et al., 2015]. Гены региона делеции участвуют в общем метаболизме клетки и

некоторые из них прямо связаны с пролиферацией. Представители семейства *SLC25* являются митохондриальными белками – переносчиками растворимых веществ и локализуются на внутренней митохондриальной мембране. Эти белки опосредуют перенос множества промежуточных продуктов метаболизма (например, АТФ/АДФ, карбоновых и аминокислот, ионов) между цитоплазмой и митохондриями. Большая часть белков этой подгруппы хорошо изучена. Наиболее интересным из этих трех генов – *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5* является ген *SLC25A43*, так как имеются данные, что он участвует в митохондриальном контроле прогрессии клеточного цикла [Tina E. et al., 2012; Gabrielson M. et al., 2013]. Клеточная пролиферация – это энергозатратный процесс, частично поддерживаемый метаболизмом митохондрий. Переход клеток через клеточный цикл строго контролируется контрольными точками, в которых задействованы циклины и циклин-зависимые протеинкиназы (Cdks). Вход клетки в G1–фазу клеточного цикла связан с всплеском митохондриальной активности, переход к фазе G1-S также увеличивает потребление митохондриального кислорода [Gabrielson M. et al., 2013]. Блокировка G1-S перехода вследствие снижения уровня АТФ в клетки или ингибирования окислительного фосфорилирования предполагает существование митохондриальной точки контроля клеточного цикла в поздней G1 фазе. Кроме того, прогрессия через G1 фазу также связана с функциями митохондрий, накоплением циклина E и изменением митохондриальной морфологии. Нокдаун гена *SLC25A43* в иммортализованных не раковых молочных эпителиальных клетках MCF10A значительно ингибировал прогрессию клеточного цикла во время перехода G1-S, что значительно уменьшало скорость пролиферации и долю Ki67-положительных клеток MCF10A. Напротив, подавленная экспрессия *SLC25A43* в HER2-позитивных клетках рака молочной железы BT-474 приводила к значительному увеличению скорости пролиферации вместе с улучшенным переходом G1-S. Это отразилось на увеличении доли положительных клеток Ki-67 и пониженного уровня ядерного p21. Таким

образом, была показана роль *SLC25A43* в качестве регулятора прогрессии клеточного цикла через предполагаемую митохондриальную контрольную точку.

Делеции Xq24 были одними из наиболее частых делеций в случаях HER2-позитивного рака молочной железы и встречались в 80% случаев [Tina E. et al., 2012]. Делеции были разного размера и захватывали гены *SLC25A43* и *SLC25A5*. *SLC25A5* переносит АДФ из митохондриального матрикса в цитоплазму и частично выполняет функции *SLC25A6* (91% гомология по составу аминокислот). Функции гена *SLC25A43* до сих пор остаются неясными, но было показано, что метилирование CpG-сайта этого гена связано с ранним появлением рака молочной железы у женщин [Tina E. et al., 2012]. Экспрессия этого гена у пациенток с делециями региона Xq24 была гетерогенной. Возможно, что это связано с различной степенью инактивации X-хромосомы у носителей различных по размеру делеций. К сожалению, в этих исследованиях не был проведен анализ характера инактивации X-хромосомы у пациенток.

По данным ретроспективного анализа собственных данных НИИ медицинской генетики пересекающаяся микроделеция в регионе Xq24, помимо женщины PLG2, была обнаружена у мальчика с задержкой умственного и моторного развития [Толмачева Е.Н. и др., 2020]. Эта микроделеция с координатами chrX:118673728 -118841277 (hg19) имела размер 168 kb, в нее вошли пять генов: *CXorf56*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPT6* и *MIR766*. Мать пробанда (2192-2) также имела микроделецию и sXCI=98% в крови и 100% в буккальном эпителии. Ребенок родился от второй беременности. Первая беременность у женщины была прервана по медицинским показаниям (МВПР: гастрошизис, деформация лучезапястных суставов) на сроке 13 недель. Эмбрион не был обследован на предмет микроделеции.

Функции гена *CXorf56* плохо изучены. Показано, что белок, кодируемый этим геном экспрессируется в коре головного мозга и нейронах мозжечка

мышь. Инсерция в гене *CXorf56*, приводящая к появлению преждевременного стоп-кодона и бессмысленной мРНК, вызывает развитие семейной формы умственной отсталости (OMIM #301013). Эта мутация была описана недавно в большой семье из 3 поколений, в которой 5 мужчин и 1 женщина имели слабую или умеренную интеллектуальную недостаточность. У двух мужчин были серьезные поведенческие проблемы, такие как повсеместное расстройство развития, расстройство внимания, гиперактивность и трангрессивное поведение. Пациенты имели различные дисморфии лица. При этом, подобно синдрому дефицита UBE2A, поражены все носители мутации мужского пола, а женщины-носительницы имеют sXCI [Verkerk A.J.M.H. et al., 2018].

Продукт гена *NKRF* кодирует транскрипционный репрессор, который является посредником между специфическими негативными регуляторными элементами и чувствительными к транскрипционному фактору NF-κB (ядерный фактор «каппа-би») (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> 14.12.2017). Ген *SEPT6* кодирует один из септинов, которые относятся к группе ГТФ-связывающихся белков или G-белков, принимающих участие во многих процессах, в том числе клеточном делении, организации цитоскелета и цитокинезе. Дисрегуляция септинов приводит к нейродегенеративным заболеваниям и болезням крови [Neubauer K., Zieger B., 2017]. Ген *MIR766* кодирует микроРНК (20-24 н), которая является важным регулятором p53-сигнального пути. Эта микроРНК ингибирует один из ключевых ингибиторов белка p53 - MDM4 [Wang Q. et al., 2017].

К сожалению, сложно конкретно назвать кандидатный ген, потеря которого при делеции на X-хромосоме у мужчин может приводить не только к формированию синдрома у живорожденных, но и к эмбриональной гибели. Синдром дефицита UBE2A, помимо нарушений интеллектуального развития, характеризуется множественными дизморфиями. Вероятно, механизмы, приводящие к формированию пороков развития, могут влиять на жизнеспособность эмбриона, подобно тому, как это происходит при

синдроме Барта, который также связан с sXCI [Ørstavik K. H. et al., 1998]. Синдром Барта – редкое X-сцепленное заболевание, которое характеризуется кардиомиопатией, скелетной миопатией, задержкой роста, нейтропенией и повышенной экскрецией 3-метилглутаконовой кислоты с мочой. Для одной трети семей, с этим синдромом характерна высокая доля пренатальной (около 18 недель гестации) либо постнатальной гибели носителей мутации мужского пола [Clarke S.L.N. et al., 2013]. Предполагают, что причиной гибели плодов является кардиомиопатия.

Процесс инактивации X-хромосомы запускается на ранних этапах развития. У человека накопление транскриптов гена *XIST* зафиксировано на 8-клеточной стадии дробления (van den Berg., 2009). Это событие совпадает по времени с активацией эмбрионального генома и началом работы контрольных точек клеточного цикла. Соответственно, часть бластомеров с геномными мутациями, такими как моносомии, отправляются в апоптоз и пул бластомеров уменьшается. Смещение инактивации X-хромосомы в этом случае имеет стохастический характер и возникает из-за компарментализации бластомеров при раннем развитии. Следствием этого события могут быть проявления X-сцепленных мутаций у женщин, в тех случаях, когда они не влияют на жизнеспособность и пролиферативные способности клетки, таких как синдром тремора/атаксии, связанным с ломкой X-хромосомой (FXTAS) или миодистрофия Дюшена [Alvarez-Mora M.I. et al., 2015, Viggiano E. et al., 2016]. Так, различные паттерны XCI были зафиксированы в одной и той же семье у носительниц мутаций в гене *DLG3*, являющихся причиной редкой не синдромальной формы X-сцепленной умственной недостаточности (XLID) (MRX90, OMIM *300189) [Gieldon L. et al., 2017]. Здоровая мать мальчика с умеренной задержкой интеллектуального развития имела 100% sXCI и инактивированную мутантную X-хромосому, ее тетя со средней степенью умственной отсталости также имела sXCI, но инактивированной у нее была вторая не мутантная X-хромосома. Две другие женщины в семье имели равновероятную XCI и среднюю степень

когнитивного расстройства - Синдром тремора/атаксии, связанный с ломкой X-хромосомой (FXTAS).

Второй причиной формирования вторичной sXCI является нарушение пролиферации части клеток, несущих активную X-хромосому вследствие мутаций в X-сцепленных генах или микроструктурных aberrаций. Интересно, что sXCI является общей чертой для носительниц многих XLID [Plenge R.M. et al., 2002]. Очевидно, это можно объяснить тем, что мутации в X-сцепленных генах влияют на жизнеспособность клетки. Гены, ответственные за синдромальные XLMR, экспрессируются в различных тканях организма и являются регуляторами транскрипции, клеточной пролиферации и развития [Plenge R.M. et al., 2002]. Но нарушение пролиферации клеток может быть причиной не только sXCI и XLID, но и эмбриональной гибели.

При проведении полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) установлено, что многие локусы в геноме человека содержат варианты, ассоциированные с перекрестными фенотипическими ассоциациями. По данным разных авторов, перекрестные фенотипические ассоциации отмечены для 4,6-70% SNP [Sivakumaran S. et al., 2011, Solovieff N. et al., 2013]. Перекрестные фенотипические ассоциации указывают на то, что перечисленные патологии имеют общие патогенетические пути и подчеркивают значимость плейотропии в заболеваниях человека. Несомненно, плейотропное действие генов может иметь место также при нарушении эмбрионального развития и заболеваниях, проявляющихся в постнатальном периоде жизни человека. До настоящего времени в литературе не описано ни одной патогенной CNV, однозначно ассоциированной исключительно с эмбриолетальностью. Например, ген *CTNNA3*, ассоциированный Rajcan-Separovic E. с коллегами с нарушением эмбриогенеза, также играет важную роль в регуляции активности мозга [Rajcan-Separovic E. et al., 2010]. Микроделеция в данном гене была зафиксирована у плода с множественными пороками развития (Cancemiet al.,

2016), а компаундная гетерозиготная делеция – у пациентов с расстройствами аутистического спектра [Vacchelli E. et al., 2014]. При анализе потенциально патогенных CNV у 51 спонтанного абортуса было выявлено 22 гена, задействованных в микроперестройках и ассоциированных с эмбриогенезом [Кашеварова А.А. и др., 2019]. При этом каждый из этих генов дополнительно связан с той или иной патологией в постнатальном периоде, а большая часть этих генов (59%) важна для нормального развития и функционирования центральной нервной системы. Таким образом, выявленные нами регионы микроперестроек на X-хромосоме и ассоциированные первоначально с нарушениями высшей нервной деятельности вполне могут быть критическими для раннего эмбрионального развития.

Таким образом, у 30% женщин с НБ и с sXCI выявлено наличие X-сцепленных микродупликаций и микроделеций.

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

Процесс инактивации может компенсировать проявление патологического фенотипа у матери-носительницы патогенетически значимого CNV за счет полной инактивации мутантной X-хромосомы. В то же время мутация может проявиться у ее потомков мужского пола, унаследовавших X-сцепленную CNV, или женского пола в случае равновероятной инактивации.

Исследование репродуктивного анамнеза женщин с sXCI и статуса инактивации у их абортусов позволяет предположить, что отсутствие патологического фенотипа у женщины-носительницы CNV связано с наличием смещения инактивации X-хромосомы, которое приводит к протективному эффекту на фенотип. Кроме того, дополнительным доказательством такого протективного эффекта может являться определение

статуса инактивации X-хромосомы на семейном материале, которое имеет ряд особенностей и ограничений.

Предположительно, микроструктурные перестройки X-хромосомы, ассоциированные с формированием асимметричной X-инактивации у пренатально погибших эмбрионов, могут происходить либо в мейозе у родителей, либо в раннем эмбриогенезе. Если абберация затрагивает регион хромосомы, несущий онкогены, то клетка с такой X-хромосомой получит селективное преимущество и инактивированной окажется нормальная X-хромосома. Если же микроструктурная хромосомная мутация окажется наследуемой от матери, то вероятнее всего ожидать смещение инактивации с избирательной инактивацией перестроенной X-хромосомы. В случае наследования перестройки от отца, невозможно сделать однозначного вывода о патогенности данной хромосомной мутации. Поэтому в любом случае для уточнения и верификации полученных данных необходимо будет анализировать семейный материал.

Для оценки статуса инактивации X-хромосомы с делецией проведено бисульфитное секвенирование продуктов ПЦР внутри регионов CNV. 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 (Рисунок 19).

Кандидатной микроструктурной перестройкой для проведения эксперимента выбрана делеция региона Xq24 у женщины PLG2 с sXCI и ПНБ. Данная перестройка затрагивает 8 генов, в том числе гены *CXorf56*, *UBE2A*, ассоциированные с тяжелыми формами XLMR. Для проведения эксперимента были доступны экстраэмбриональные ткани и ДНК женщины-носительницы PLG2, её матери-носительницы (PLG2-7), здоровых сестры (Ж2) и супруга (М4). Кроме того, проанализирована ДНК женщины-носительницы (2192-2) делеции Xq24. В качестве контроля использована ДНК без мутаций в регионе Xq24: 3 образца с кариотипом 46,XY и 5

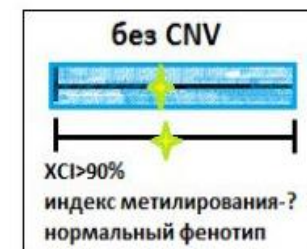
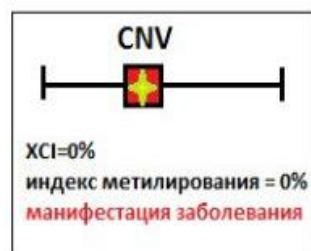
образцов с кариотипом 46,XX с установленным уровнем инактивации X-хромосомы (Таблица 11, Рисунок 20).

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

Таблица 11 - Результаты бисульфитного секвенирования региона Xq24

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

мужчина



женщина

Рисунок 19 - Варианты локализации CNV (делеция) и соответствующего уровня метилирования

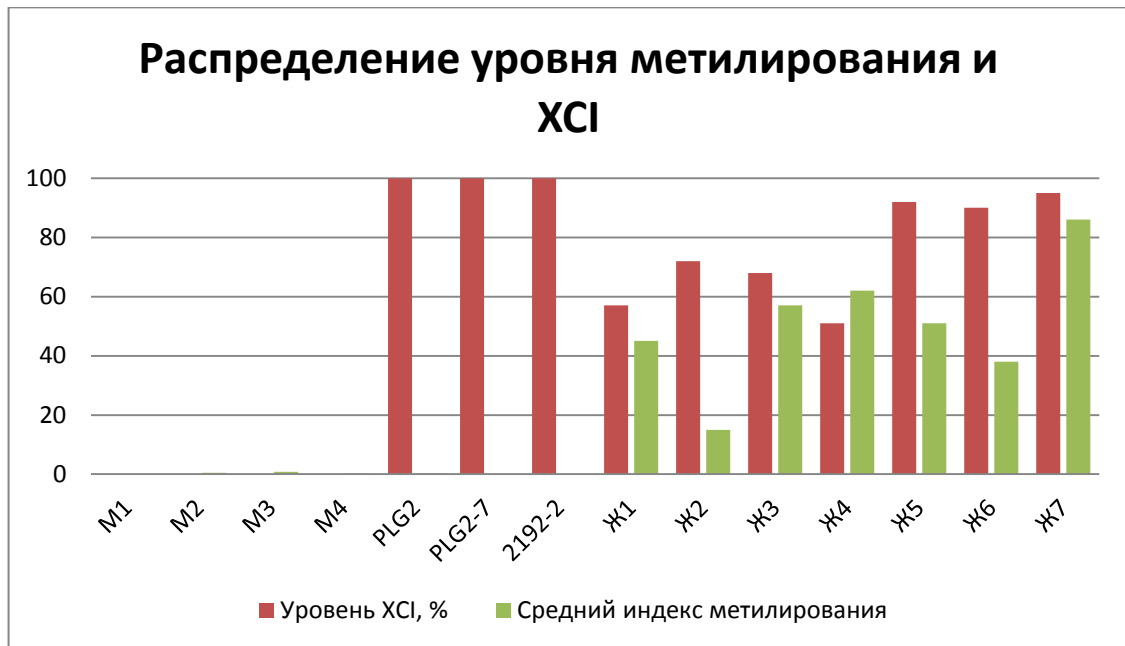


Рисунок 20 - Распределение уровня метилирования и XCI

3.7 Алгоритм диагностики X-сцепленных CNV у женщин с невынашиванием беременности

Исходя из полученных данных, был разработан алгоритм диагностики и интерпретации X-сцепленных CNV (Рисунок 21). При обращении на консультацию к врачу-генетику пары с невынашиваем беременностями 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 сравнительной матричной гибридизации. 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 возможностей лаборатории.

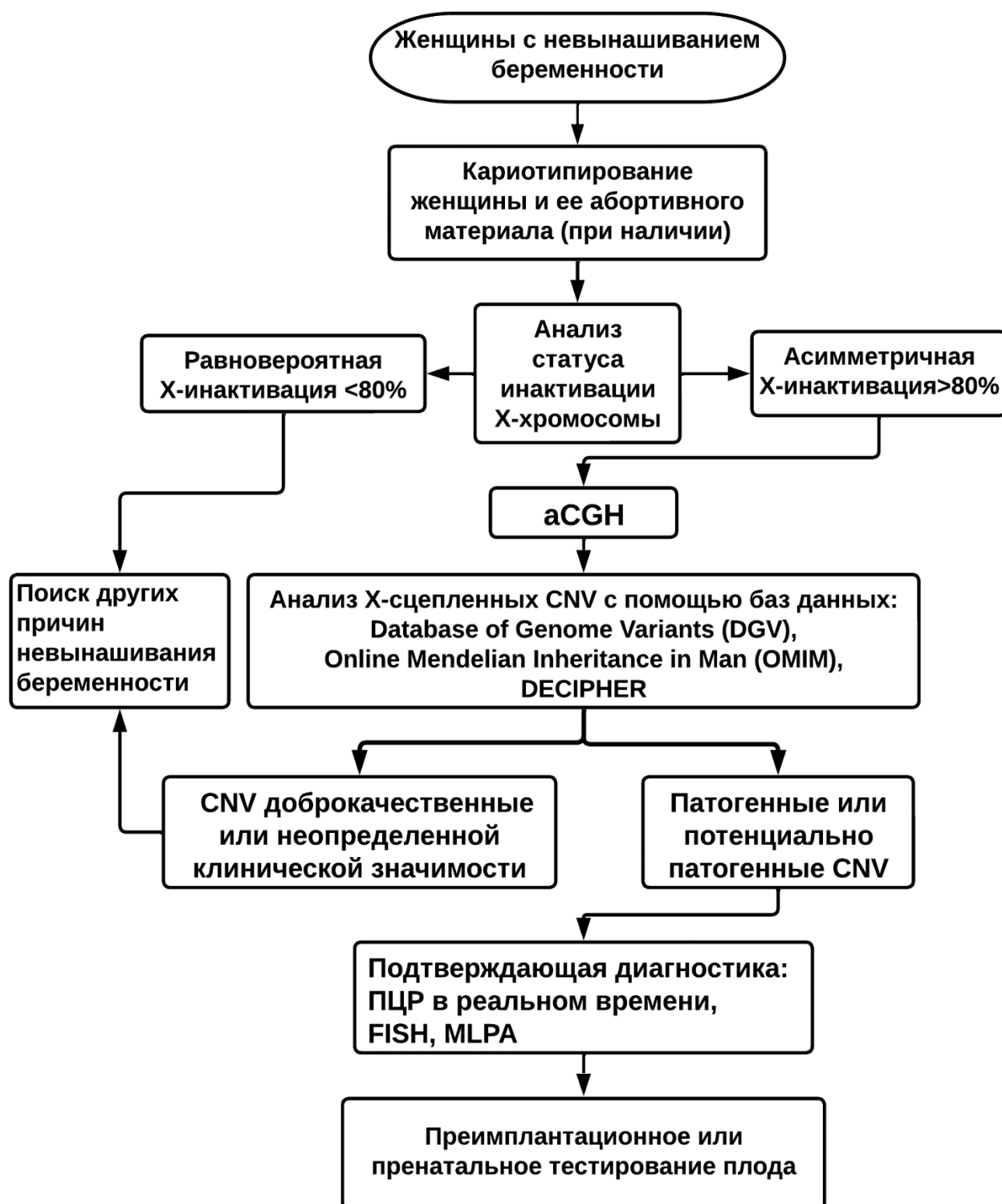


Рисунок 21 - Алгоритм диагностики и интерпретации X-сцепленных CNV у женщин с невынашиванием беременности.

Выявленные CNV классифицируют с помощью баз данных – DGV (Database of Genome Variants), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), DECIPHER (v11.12: Mapping the clinical genome), а также отдельных

публикаций, полученных преимущественно из базы данных PubMed NCBI. Носительницам патогенных CNV показано 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. В настоящее время диагностика дупликаций у плода или в бластоцисте возможна только косвенными методами с использованием полиморфных STR-маркеров. Для диагностики делеций можно использовать как косвенные, так и прямые методы (aCGH).

В качестве примера такой диагностики можно рассмотреть случай диагностики у женщины носительницы делеции в регионе Xq24. Анализ сегрегации микроделеции в семье и оценка ее связи с эмбриональной гибелью позволили создать панель из 12 информативных полиморфных STR-маркеров, позволяющих выполнить гаплотипирование нормальной и мутантной X-хромосомы в этой семье для преимплантационного генетического тестирования (PGT-M) бластоцист женщины PLG2 [Lebedev et al., 2020]. С помощью ИКСИ были оплодотворены девять ооцитов пациентки и получены 8 зигот в программе ЭКО при стандартной стимуляции яичников. На 5-6 день развития была произведена биопсия трофэктодермы от 4 бластоцист и осуществлена полногеномная амплификация ДНК (WGA). Для трех образцов было успешно выполнено STR-гаплотипирование в сочетании с анализом генов *AMEL* и *SRY*, а также с преимплантационным генетическим тестированием на анеуплоидию методом array-CGH (PGT-A). Один из эмбрионов женского пола не имел каких-либо хромосомных анеуплоидий и микроделеции Xq24 и был рекомендован к переносу (Таблица 12).

Таблица 12 - Результаты преимплантационного генетического тестирования эмбрионов пациентки PLG2

Эмбрион	STR-гаплотипирование (Xq24)	aCGH	Рекомендация к переносу
Эмбрион E2	Женский пол, гетерозигота по delXq24	Женский пол, гетерозигота delXq24, моносомия хромосомы 4	Нет
Эмбрион E5	Женский пол, здоров	Женский пол, патогенных микроструктурных перестроек не выявлено	Да
Эмбрион E6	Мужской пол, delXq24	Мужской пол, гемизигота delXq24	Нет

Второй случай диагностики X-сцепленной CNV - arr[hg19]Xq24(118673728_118841277)×0 с последующим проведением пренатальной диагностики был осуществлен с помощью ПЦР в реальном времени. Первая беременность у носительницы перестройки, у которой наблюдалась 100% ХСІ, была прервана в связи с МВПР у плода, затем родился больной ребенок, которому, соответственно, после проведения aCGH был поставлен диагноз «синдром Насименто». В ходе третьей и четвертой беременности для женщины была проведена инвазивная пренатальная диагностика с использованием комбинации методов микроматричного анализа и ПЦР в реальном времени с праймерами на гены *UBE2A* и *SEPT6* (Рисунок 22). Обе беременности завершились рождением здоровых девочек, не являющихся носительницами микроделеции Xq24.

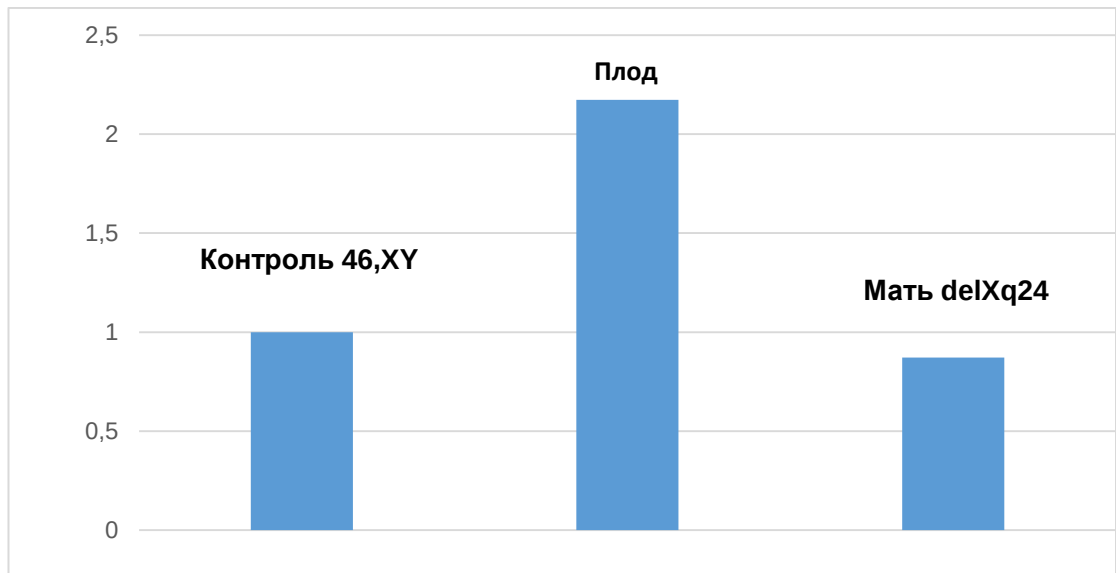


Рисунок 22 - Результаты ПЦР в реальном времени с праймерами на экзон 6 гена *UBE2A*. Мать является носителем делеции Xq24, плод женского пола унаследовал ее нормальную X-хромосому.

Ось абсцисс – обследуемые, ось ординат – кратность отличий в копийности участка ДНК по сравнению с контролем.

Таким образом, представленный алгоритм предлагает новые стратегии ПД и ПГТ у женщин с привычным невынашиванием беременности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Асимметричная инаktivация 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 инаktivации X-хромосомы составила 6,7%, что статистически значимо ($p=0,019$) превышает частоту асимметричной инаktivации 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 инаktivации 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 инаktivации X хромосомы – первичное и вторичное смещение, то в исследовании были изучены оба варианта. Первичное смещение инаktivации может быть результатом нарушения работы генов, контролирующих процесс инаktivации 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 *XACT*. 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 *XACT* 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 *XACT*, 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 плейотропные эффекты хромосомных вариантов. Для исключения возможного носительства выявленных CNV у здоровых людей 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 полногеномного секвенирования). 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 СОКРАЩЕНИЙ

aCGH – (от англ. Array Comparative Genomic Hybridization) – сравнительная геномная гибридизация на микрочипах

CNV – (от англ. Copy Number Variations) – вариации числа копий участков ДНК

FISH – (от англ. Fluorescence *In Situ* Hybridization) – флуоресцентная гибридизация *in situ*

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

SDS – (от англ. Sodium Dodecyl Sulfate) – раствор додецилсульфата натрия

SNP – (от англ. Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

SSC – (от англ. Saline Sodium Citrate) – раствор цитрата и хлорида натрия

sXCI – (от англ. skewed X-chromosome inactivation) – асимметричная инактивация X-хромосомы

TAE – (от англ. Tris-Acetate and EDTA) – трис-ацетатный буфер

WES – (от англ. Whole Exome Sequencing) – полноэкзомное секвенирование

XCI – (от англ. X-chromosome inactivation) – инактивация X-хромосомы

XIC – (от англ. X-inactivation center) – центр инактивации X-хромосомы

XLID – (от англ. X-Linked Intellectual Disability) – X-сцепленная умственная отсталость

ВПР – врожденные пороки развития

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

е.а. – единица активности

ЗПР – задержка психического развития

иПНБ – идиопатическое привычное невынашивание беременности

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

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

ЭДТА – этилендаминтетрауксусная кислота

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аноприенко О. В., Закиян С. М. Эволюция половых хромосом млекопитающих: взаимодействие генетических и эпигенетических факторов //Генетика. – 2004. – Т. 40. – №. 8. – С. 1013-1033.
2. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. – ООО «Издательство Н-Л», 2007. – С. 640-640.
3. Богомазова А. Н. и др. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования //Генетика. – 2015. – Т. 51. – №. 4. – С. 466-466.
4. Кашеварова А. А. и др. Клинико-генетическая характеристика недифференцированной умственной отсталости на основе матричной сравнительной геномной гибридизации //Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2013. – Т. 113. – №. 9. – С. 70.
5. Кашеварова А. А., Лебедев И. Н. Геномная архитектура хромосомных болезней человека //Генетика. – 2016. – Т. 52. – №. 5. – С. 511-511.
6. Лебедев И. Н., Никитина Т. В. Цитогенетика нарушений эмбрионального развития человека. – 2013.
7. Лебедев И. Н. и др. Матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH) в диагностике хромосомного дисбаланса CNV-полиморфизма при анэмбрионии //Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62. – №. 2. – С. 117-125.
8. Лялина А. А. и др. Тяжёлое течение мышечной дистрофии Дюшенна у девочки 7 лет //Российский педиатрический журнал. – 2021. – Т. 24. – С. 34.
9. Панова А. В. и др. Метилирование локуса AR человека не коррелирует с наличием инактивированной X-хромосомы в клетках с индуцированной плюрипотентностью //Генетика. – 2020. – Т. 56. – №. 3. – С. 321-327.
10. Пристяжнюк И. Е., Мензоров А. Г. Изучение инактивации X-хромосом в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках американской норки //Цитология. – 2017. – Т. 59. – №. 11. – С. 783-783.

11. Сурин В. Л. и др. Новая миссенс-мутация HIS2026ARG в гене фактора VIII, выявленная у двух пациенток с клиническим проявлением гемофилии А //Генетика. – 2018. – Т. 54. – №. 6. – С. 688-693.
12. Твеленёва А. А., Шилова Н. В. Методы верификации субмикроскопических клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК //Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18. – №. 3. – С. 26-38.
13. Толмачева Е. Н., Кашеварова А. А., Лебедев И. Н. Инактивация X-хромосомы и патология человека //Медицинская генетика. – 2009. – Т. 8. – №. 7. – С. 9-15.
14. Толмачёва Е. Н. и др. Асимметричная инактивация X-хромосомы у эмбрионов человека с мозаичной трисомией хромосомы 16 //Генетика. – 2011. – Т. 47. – №. 3. – С. 401-405.
15. Толмачева Е.Н. и др. Асимметричная инактивация X-хромосомы у внутриутробно погибших эмбрионов человека //Цитология. – 2015. – Т. 57. – №. 11. – С. 808-812.
16. Толмачёва Е. Н. и др. Эпигенетическая модификация X-сцепленных CNV в норме и патологии //Медицинская генетика. – 2018. – Т. 17. – №. 11. – С. 29-33.
17. Шевченко А. И. Феномен инактивации X-хромосомы и заболевания человека //Гены и клетки. – 2016. – Т. 11. – №. 2. – С. 61-69.
18. Шилова Н. В., Миньженкова М. Е. Интерпретация клинически значимых вариаций числа копий ДНК // Медицинская генетика. – 2018. – Т. 17. – № 10. – С. 15–19.
19. Allen R. C. et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation //American journal of human genetics. – 1992. – V. 51. – №. 6. – P. 1229.

20. Alvarez-Mora M. I. et al. Deregulation of key signaling pathways involved in oocyte maturation in FMR1 premutation carriers with Fragile X-associated primary ovarian insufficiency //Gene. – 2015. – V. 571. – №. 1. – P. 52-57.
21. Amos-Landgraf J. M. et al. X Chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females //The American Journal of Human Genetics. – 2006. – V. 79. – №. 3. – P. 493-499.
22. Bacchelli E. et al. A CTNNA3 compound heterozygous deletion implicates a role for α T-catenin in susceptibility to autism spectrum disorder //Journal of neurodevelopmental disorders. – 2014. – V. 6. – P. 1-11.
23. Bagheri H. et al. Genomic characteristics of miscarriage copy number variants //Molecular human reproduction. – 2015. – V. 21. – №. 8. – P. 655-661.
24. Bagislar S. et al. Extremely skewed X-chromosome inactivation patterns in women with recurrent spontaneous abortion //Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology. – 2006. – V. 46. – №. 5. – P. 384-387.
25. Bajic V. et al. Treatment of Alzheimer's disease: classical therapeutic approach //Current Pharmaceutical Analysis. – 2016. – V. 12. – №. 2. – P. 82-90.
26. Balaton B. P., Cotton A. M., Brown C. J. Derivation of consensus inactivation status for X-linked genes from genome-wide studies //Biology of sex differences. – 2015. – V. 6. – №. 1. – P. 1-11.
27. Bamforth F., Machin G., Innes M. X- chromosome inactivation is mostly random in placental tissues of female monozygotic twins and triplets //American journal of medical genetics. – 1996. – V. 61. – №. 3. – P. 209-215.
28. Bauters M. et al. Detection and validation of copy number variation in X-linked mental retardation //Cytogenetic and Genome Research. – 2009. – V. 123. – №. 1-4. – P. 44-53.
29. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory //Genes & development. – 2002. – V. 16. – №. 1. – P. 6-21.

30. Bolduc V. et al. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans //The Journal of clinical investigation. – 2007. – V. 118. – №. 1.
31. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – 2014. – V. 30 - №15. – P. 2114-2120
32. Brown C. J., Gready J. M. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation //TRENDS in Genetics. – 2003. – V. 19. – №. 8. – P. 432-438.
33. Brown C. J., Willard H. F. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation //Nature. – 1994. – V. 368. – №. 6467. – P. 154-156.
34. Budny B. et al. Novel missense mutations in the ubiquitination-related gene UBE2A cause a recognizable X-linked mental retardation syndrome //Clinical genetics. – 2010. – V. 77. – №. 6. – P. 541-551.
35. Bug S. et al. Diagnostic utility of novel combined arrays for genome-wide simultaneous detection of aneuploidy and uniparental isodisomy in losses of pregnancy //Molecular Cytogenetics. – 2014. – V. 7. – №. 1. – P. 1-9.
36. Busque L., Paquette Y., Provost S., Roy D-C., Levine R.L., Mollica L., et al. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies //Blood. – 2009. – V.113 – P. 3472–4.
37. Byrne AB, Arts P, Ha TT, Kassahn KS, Pais LS, O'Donnell-Luria A; Broad Institute Center for Mendelian Genomics; Babic M, Frank MSB, Feng J, Wang P, Lawrence DM, Eshraghi L, Arriola L, Toubia J, Nguyen H; Genomic Autopsy Study Research Network; McGillivray G, Pinner J, McKenzie F, Morrow R, Lipsett J, Manton N, Khong TY, Moore L, Liebelt JE, Schreiber AW, King-Smith SL, Hardy TSE, Jackson MR, Barnett CP, Scott HS. Genomic autopsy to identify underlying causes of pregnancy loss and perinatal death // Nature Medicine. – 2023. – V. 29. – № 1. – P. 180-189. doi: 10.1038/s41591-022-02142-1

38. Cai G., Edelman L., Goldsmith J.E. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT //BMC Medical Genomics. 2008. - V. 1. - №. 1. - P. 1-14. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-1-50>
39. Capalbo A., Rienzi L., Ubaldi F. M. Diagnosis and clinical management of duplications and deletions //Fertility and sterility. – 2017. – V. 107. – №. 1. – P. 12-18.
40. Carrel L., Willard H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females //Nature. – 2005. – V. 434. – №. 7031. – P. 400-404.
41. Chadwick B. P., Willard H. F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101. – №. 50. – P. 17450-17455.
42. Chao W. et al. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice //Science. – 2002. – V. 295. – №. 5553. – P. 345-347.
43. Chen Y. et al. Characterization of chromosomal abnormalities in pregnancy losses reveals critical genes and loci for human early development //Human mutation. – 2017. – V. 38. – №. 6. – P. 669-677.
44. Chow J. C. et al. Inducible XIST-dependent X-chromosome inactivation in human somatic cells is reversible //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – V. 104. – №. 24. – P. 10104-10109.
45. Clarke S. L. N. et al. Barth syndrome //Orphanet journal of rare diseases. – 2013. – V. 8. – №. 1. – P. 1-17.
46. Courtier B., Heard E., Avner P. Xce haplotypes show modified methylation in a region of the active X chromosome lying 3'to Xist //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – V. 92. – №. 8. – P. 3531-3535.
47. Czeschik J. C. et al. X-linked intellectual disability type Nascimento is a clinically distinct, probably underdiagnosed entity //Orphanet journal of rare diseases. – 2013. – V. 8. – №. 1. – P. 1-14.

48. De Leeuw N. et al. UBE2A deficiency syndrome: Mild to severe intellectual disability accompanied by seizures, absent speech, urogenital, and skin anomalies in male patients //American Journal of Medical Genetics Part A. – 2010. – V. 152. – №. 12. – P. 3084-3090.
49. Delcuve G. P., Rastegar M., Davie J. R. Epigenetic control //Journal of cellular physiology. – 2009. – V. 219. – №. 2. – P. 243-250.
50. Deng X. et al. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease //Nature Reviews Genetics. – 2014. – V. 15. – №. 6. – P. 367-378.
51. Delcuve G. P., Rastegar M., Davie J. R. Epigenetic control //Journal of cellular physiology. – 2009. – V. 219. – №. 2. – P. 243-250.
52. Di-Battista A. et al. Unusual X-chromosome inactivation pattern in patients with Xp11. 23-p11. 22 duplication: Report and review //American Journal of Medical Genetics Part A. – 2016. – V. 170. – №. 12. – P. 3271-3275.
53. Disteche C. M. Escape from X inactivation in human and mouse //Trends in Genetics. – 1995. – V. 11. – №. 1. – P. 17-22.
54. Disteche, Christine M. "Escapees on the X chromosome." Proceedings of the National Academy of Sciences 96.25 (1999): 14180-14182
55. Eiben B. et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage //American journal of human genetics. – 1990. – V. 47. – №. 4. – P. 656.
56. El-Hattab A. W. et al. Int22h-1/int22h-2-mediated Xq28 rearrangements: intellectual disability associated with duplications and in utero male lethality with deletions //Journal of medical genetics. – 2011. – V. 48. – №. 12. – P. 840-850.
57. Esplin E., Li B., Slavotinek A. et al. Nine patients with Xp22.31 microduplication, cognitive deficits, seizures, and talipes anomalies //American Journal of Medical Genetics Part A. - 2014. - V. 164. - № 8. - P. 2097-2103. doi:10.1002/ajmg.a.36598

58. Evdokimova V. N. et al. About the sex ratio in connection with early embryonic mortality in man //Russian Journal of Developmental Biology. – 2000. – V. 31. – №. 4. – P. 204-210.
59. Finley J. et al. The genomic basis of sporadic and recurrent pregnancy loss: a comprehensive in-depth analysis of 24,900 miscarriages //Reproductive BioMedicine Online. – 2022.
60. Ford H. B., Schust D. J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy //Reviews in obstetrics and gynecology. – 2009. – V. 2. – №. 2. – P. 76.
61. Gabrielson M., Tina E. The mitochondrial transport protein SLC25A43 affects drug efficacy and drug-induced cell cycle arrest in breast cancer cell lines //Oncology Reports. – 2013. – V. 29. – №. 4. – P. 1268-1274.
62. Gale R. E. et al. Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. – 1994.
63. Gao J. et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion //Molecular cytogenetics. – 2012. – V. 5. – P. 1-7.
64. Gécz J., Shoubridge C., Corbett M. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X //Trends in Genetics. - 2009. - V. 25. № 7. - P. 308-316. doi:10.1016/j.tig.2009.05.002
65. Gieldon L. et al. Skewed X-inactivation in a family with DLG3-associated X-linked intellectual disability //American Journal of Medical Genetics Part A. – 2017. – V. 173. – №. 9. – P. 2545-2550.
66. Girirajan S., Campbell C. D., Eichler E. E. Human copy number variation and complex genetic disease //Annual review of genetics. – 2011. – V. 45. – P. 203.
67. Goodship J., Carter J., Burn J. X- inactivation patterns in monozygotic and dizygotic female twins //American Journal of Medical Genetics. – 1996. – V. 61. – №. 3. – P. 205-208.

68. Haddad D. M. et al. Mutations in the intellectual disability gene Ube2a cause neuronal dysfunction and impair parkin-dependent mitophagy //Molecular cell. – 2013. – V. 50. – №. 6. – P. 831-843.
69. Hall L. L. et al. X-inactivation reveals epigenetic anomalies in most hESC but identifies sublines that initiate as expected //Journal of cellular physiology. – 2008. – V. 216. – №. 2. – P. 445-452.
70. Hassold T. et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions //Annals of human genetics. – 1980. – V. 44. – №. 2. – P. 151-164.
71. Honda S. et al. Novel deletion at Xq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation //Journal of human genetics. – 2010. – V. 55. – №. 4. – P. 244-247.
72. Hu H. et al. Xp22. 31 copy number variations in 87 fetuses: refined genotype–phenotype correlations by prenatal and postnatal follow-up //BMC Medical Genomics. – 2023. – V. 16. – №. 1. – P. 1-9.
73. Hurles M. E., Dermitzakis E. T., Tyler-Smith C. The functional impact of structural variation in humans //Trends in Genetics. – 2008. – V. 24. – №. 5. – P. 238-245.
74. Irizarry K. A. et al. Prader Willi syndrome: genetics, metabolomics, hormonal function, and new approaches to therapy //Advances in pediatrics. – 2016. – V. 63. – №. 1. – P. 47-77.
75. Jevé Y. B., Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages //Journal of human reproductive sciences. – 2014. – V. 7. – №. 3. – P. 159.
76. Johnston C. M. et al. Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete //PLoS genetics. – 2008. – V. 4. – №. 1. – P. e9.
77. Jurka J. Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements // Trends Genet. – 2000. – V. 16 - №9. – P. 418-420.
78. Kelsey A. D. et al. Impact of flanking chromosomal sequences on localization and silencing by the human non-coding RNA XIST //Genome biology. – 2015. – V. 16. – №. 1. – P. 1-16.

79. Knudsen G. P. S. et al. Increased skewing of X chromosome inactivation in Rett syndrome patients and their mothers //European journal of human genetics. – 2006. – V. 14. – №. 11. – P. 1189-1194.
80. Koolen D. A. et al. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications //Human mutation. – 2009. – V. 30. – №. 3. – P. 283-292.
81. Kuo P. L. et al. Association of extremely skewed X-chromosome inactivation with Taiwanese women presenting with recurrent pregnancy loss //Journal of the Formosan Medical Association. – 2008. – V. 107. – №. 4. – P. 340-343.
82. Lanasa M. C. et al. A novel X chromosome–linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion //American journal of obstetrics and gynecology. – 2001. – V. 185. – №. 3. – P. 563-568.
83. Lathi R. B. et al. Informatics enhanced SNP microarray analysis of 30 miscarriage samples compared to routine cytogenetics //PLoS One. – 2012. – V. 7. – №. 3. – P. e31282.
84. Lau A.W. et al. Skewed X-chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism //The American Journal of Human Genetics. – 1997. – V. 61. – №. 6. – P. 1353-1361.
85. 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 I., Svetlakov A.. First report about preimplantation genetic testing for the Xq24 microdeletion related to X-linked mental retardation, Nascimento type in woman with recurrent pregnancy loss. //Human Reproduction. - 2020. – V. 35 (Suppl). – P.78-79.
86. Ledbetter D. H. et al. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader–Willi syndrome //New England Journal of Medicine. – 1981. – V. 304. – №. 6. – P. 325-329.
87. Lee H. J. et al. En bloc and segmental deletions of human XIST reveal X chromosome inactivation-involving RNA elements //Nucleic acids research. – 2019. – V. 47. – №. 8. – P. 3875-3887.

88. Lengner C. J. et al. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations //Cell. – 2010. – V. 141. – №. 5. – P. 872-883.
89. Leon L. et al. Activities of steroid metabolic enzymes in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome //Steroids. – 2008. – V. 73. – №. 1. – P. 88-95.
90. Levin J. H., Kaler S. G. Non-random maternal X-chromosome inactivation associated with PHACES //Clinical genetics. – 2007. – V. 72. – №. 4. – P. 345-350.
91. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs //Bioinformatics. 2002. V. 18. № 11. P. 1427–1431. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>
92. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs //Bioinformatics. 2002. - V.18. - № 11. - P. 1427–1431.
93. Li F., Shen Y., Köhler U. et al. Interstitial microduplication of Xp22.31: Causative of intellectual disability or benign copy number variant //Eur J Med Genet. - 2010. - V. 53. - №. 2. - P. 93-99. doi:10.1016/j.ejmg.2010.01.004
94. Lin S. B. et al. Improved assay performance of single nucleotide polymorphism array over conventional karyotyping in analyzing products of conception //Journal of the Chinese Medical Association. – 2015. – V. 78. – №. 7. – P. 408-413.
95. Liu P., Erez A., Sreenath Nagamani S. et al. Copy number gain at Xp22.31 includes complex duplication rearrangements and recurrent triplications //Hum Mol Genet. - 2011. - V. 20 - №. 10. - P. 1975-1988. doi:10.1093/hmg/ddr078
96. Loda A., Heard E. Xist RNA in action: Past, present, and future //PLoS genetics. – 2019. – T. 15. – №. 9. – C. e1008333.
97. Lugtenberg D. et al. Recurrent deletion of ZNF630 at Xp11. 23 is not associated with mental retardation //American journal of medical genetics Part A. – 2010. – V. 152. – №. 3. – P. 638-645.

98. Luo Y. et al. High-resolution chromosomal microarray analysis of early-stage human embryonic stem cells reveals an association between X chromosome instability and skewed X inactivation //Cell & Bioscience. – 2014. – V. 4. – №. 1. – P. 1-10.
99. Lyon M. F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome //American journal of human genetics. – 1962. – V. 14. – №. 2. – P. 135.
100. Macklon N. S., Geraedts J. P. M., Fauser B. C. J. M. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss //Human reproduction update. – 2002. – V. 8. – №. 4. – P. 333-343.
101. Madrigal I. et al. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation //BMC genomics. – 2007. – V. 8. – №. 1. – P. 1-10
102. McKenna A. et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // Genome research. – 2010. – V. 20 - №9. – P. 1297-1303.
103. Mekhoubad S. et al. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling //Cell stem cell. – 2012. – V. 10. – №. 5. – P. 595-609.
104. Miller D. T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies //The American Journal of Human Genetics. – 2010. – V. 86. – №. 5. – P. 749-764.
105. Minks J. et al. A skewed view of X chromosome inactivation //The Journal of clinical investigation. – 2008. – V. 118. – №. 1. – P. 20-23.
106. Migeon B.R. Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells //Cytogenetic and Genome Research. – 1998. – V. 80. – №. 1-4. – P. 142-148.
107. Migeon B. X-linked diseases: susceptible females// Genet. Med. - 2020. - V. 22 - № 7 - P. 1156-1174. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0779-4>
108. Moreira de Mello J. C. et al. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome //PloS one. – 2010. – V. 5. – №. 6. – P. e10947.

109. Motosugi N. et al. Deletion of lncRNA XACT does not change expression dosage of X-linked genes, but affects differentiation potential in hPSCs //Cell Reports. – 2021. – V. 35. – №. 10. – P. 109222.
110. Napolitano L. et al. Hypogonadism in patients with Prader Willi syndrome: A narrative review //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 4. – P. 1993.
111. Nascimento R. M. P. et al. UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome //The American Journal of Human Genetics. – 2006. – V. 79. – №. 3. – P. 549-555.
112. Nazor K. L. et al. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives //Cell stem cell. – 2012. – V. 10. – №. 5. – P. 620-634.
113. Neubauer K., Zieger B. The mammalian septin interactome //Frontiers in cell and developmental biology. – 2017. – V. 5. – P. 3.
114. Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states //Cell stem cell. – 2009. – V. 4. – №. 6. – P. 487-492.
115. Nguyen D. K., Disteche C. M. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals //Nature genetics. – 2006. – V. 38. – №. 1. – P. 47-53.
116. Noor A., Gianakopoulos P.J., Fernandez B. et al. Copy number variation analysis and sequencing of the X-linked mental retardation gene TSPAN7/TM4SF2 in patients with autism spectrum disorder //Psychiatric Genetics. – 2009. – V. 19. – №. 3. – P. 154-155. doi: 10.1097/YPG.0b013e32832a4fe5
117. Okamoto I. et al. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development //Nature. – 2011. – V. 472. – №. 7343. – P. 370-374.
118. Ørstavik K. H. et al. X chromosome inactivation in carriers of Barth syndrome //The American Journal of Human Genetics. – 1998. – V. 63. – №. 5. – P. 1457-1463.

119. Ørstavik K. H. X chromosome inactivation in clinical practice// Human genetics. – 2009. - V. 126.3 – P. 363-373.
120. Orzack S. H. et al. The human sex ratio from conception to birth //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – V. 112. – №. 16. – P. E2102-E2111.
121. Pavone P., Corsello G., Marino S. et al. Microcephaly/trigonocephaly, intellectual disability, autism spectrum disorder, and atypical dysmorphic features in a boy with Xp22. 31 duplication //Molecular Syndromology. - 2018. - V. 9. - P. 253-258. doi: 10.1159/000493174
122. Patel S. et al. Human embryonic stem cells do not change their X inactivation status during differentiation //Cell reports. – 2017. – V. 18. – №. 1. – P. 54-67.
123. Patrat C., Ouimette J. F., Rougeulle C. X chromosome inactivation in human development //Development. – 2020. – V. 147. – №. 1. – P. dev183095.
124. Pauta M. et al. Added value of chromosomal microarray analysis over karyotyping in early pregnancy loss: systematic review and meta-analysis //Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. – 2018. – V. 51. – №. 4. – P. 453-462.
125. Pegoraro E. et al. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28 //The American Journal of Human Genetics. – 1997. – V. 61. – №. 1. – P. 160-170.
126. Peeters S. B., Yang C., Brown C. J. Have humans lost control: The elusive X-controlling element //Seminars in Cell & Developmental Biology. – Academic Press, 2016. – V. 56. – P. 71-77.
127. Plenge R. M. et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation //Nature genetics. – 1997. – V. 17. – №. 3. – P. 353-356.
128. Plenge R. M. et al. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders //The American Journal of Human Genetics. – 2002. – V. 71. – №. 1. – P. 168-173.

129. Rajcan-Separovic E. et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss //Human Reproduction. – 2010. – V. 25. – №. 11. – P. 2913-2922.
130. Redon R. et al. Global variation in copy number in the human genome //nature. – 2006. – V. 444. – №. 7118. – P. 444-454.
131. Redonnet-Vernhet I. et al. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene //Journal of medical genetics. – 1996. – V. 33. – №. 8. – P. 682-688.
132. Riggs E. R. et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). – 2020
133. Rosenfeld J. A. et al. Diagnostic utility of microarray testing in pregnancy loss //Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. – 2015. – V. 46. – №. 4. – P. 478-486.
134. Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., et al. The DNA sequence of the human X chromosome //Nature. - 2005. - V.434. - P.325–337.
<https://doi.org/10.1038/nature03440>
135. Sahoo T. et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges //Genetics in medicine. – 2017. – V. 19. – №. 1. – P. 83-89..
136. Saravelos S. H., Li T. C. Unexplained recurrent miscarriage: how can we explain it? //Human reproduction. – 2012. – V. 27. – №. 7. – P. 1882-1886.
137. Sivakumaran S. et al. Abundant pleiotropy in human complex diseases and traits //The American Journal of Human Genetics. – 2011. – V. 89. – №. 5. – P. 607-618.
138. Sharp A., Robinson D., Jacobs P. Age-and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women //Human genetics. – 2000. – V. 107. – №. 4. – P. 343-349.

139. Shen Y. et al. X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – V. 105. – №. 12. – P. 4709-4714.
140. Shen J. et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology //Molecular cytogenetics. – 2016. – V. 9. – №. 1. – P. 1-7.
141. Silva S. S. et al. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – V. 105. – №. 12. – P. 4820-4825.
142. Solovieff N. et al. Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies //Nature Reviews Genetics. – 2013. – V. 14. – №. 7. – P. 483-495.
143. Su M. T., Lin S. H., Chen Y. C. Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis //Fertility and sterility. – 2011. – V. 96. – №. 6. – P. 1435-1444.
144. Sudmant P. H. et al. Global diversity, population stratification, and selection of human copy-number variation //Science. – 2015. – V. 349. – №. 6253. – P. aab3761.
145. Sui Y., Chen Q., Sun X. Association of skewed X chromosome inactivation and idiopathic recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis //Reproductive BioMedicine Online. – 2015. – V. 31. – №. 2. – P. 140-148.
146. Sullivan A. E. et al. Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation //Obstetrics & Gynecology. – 2003. – V. 101. – №. 6. – P. 1236-1242.
147. Tchieu J. et al. Female human iPSCs retain an inactive X chromosome //Cell stem cell. – 2010. – V. 7. – №. 3. – P. 329-342.
148. Thunstrom S. et al. UBE2A deficiency syndrome: a report of two unrelated cases with large Xq24 deletions encompassing UBE2A gene //American journal of medical genetics Part A. – 2015. – V. 167. – №. 1. – P. 204-210.

149. Tina E. et al. The mitochondrial transporter SLC25A43 is frequently deleted and may influence cell proliferation in HER2-positive breast tumors //Bmc cancer. – 2012. – V. 12. – №. 1. – P. 1-9.
150. Tolmacheva E. N. et al. 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.
151. Tsurusaki Y. et al. A novel UBE2A mutation causes X-linked intellectual disability type Nascimento //Human genome variation. – 2017. – V. 4. – №. 1. – P. 1-4.
152. Tucker T. et al. Single exon-resolution targeted chromosomal microarray analysis of known and candidate intellectual disability genes //European Journal of Human Genetics. – 2014. – V. 22. – №. 6. – P. 792-800.
153. Uehara S. et al. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss //Fertility and sterility. – 2001. – V. 76. – №. 5. – P. 908-914.
154. Utine G.E., Kiper P.Ö., Alanay Y. et al. Searching for copy number changes in nonsyndromic X-linked intellectual disability //Molecular Syndromology. 2011. V. 2. №. 2. P. 64-71. <https://doi.org/10.1159/000334289>
155. Vaglio A. et al. Prenatal and postnatal characterization of a de novo Xq22. 1 terminal deletion //Genetic Testing. – 2006. – V. 10. – №. 4. – P. 272-276.
156. Vallot C. et al. Erosion of X chromosome inactivation in human pluripotent cells initiates with XACT coating and depends on a specific heterochromatin landscape //Cell stem cell. – 2015. – V. 16. – №. 5. – P. 533-546.
157. Vallot C. et al. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells //Nature genetics. – 2013. – V. 45. – №. 3. – P. 239-241.

158. van den Berg I. M. et al. X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos //The American Journal of Human Genetics. – 2009. – V. 84. – №. 6. – P. 771-779.
159. Vandewalle J. et al. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination //The American Journal of Human Genetics. – 2009. – V. 85. – №. 6. – P. 809-822.
160. Verkerk A. J. M. H. et al. CXorf56, a dendritic neuronal protein, identified as a new candidate gene for X-linked intellectual disability //European Journal of Human Genetics. – 2018. – V. 26. – №. 4. – P. 552-560.
161. Viaggi C. D. et al. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH //Journal of applied genetics. – 2013. – V. 54. – P. 353-359.
162. Viggiano E. et al. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy //Human Genetics. – 2016. – V. 135. – №. 7. – P. 685-698.
163. Vissers L. E. L. M., Gilissen C., Veltman J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders // Nat. Rev. Genet. – 2016. – V. 17. – № 1. – P. 9–18.
164. Wang Q., Selth L. A., Callen D. F. MiR-766 induces p53 accumulation and G2/M arrest by directly targeting MDM4 //Oncotarget. – 2017. – V. 8. – №. 18. – P. 29914.
165. Wang Y. et al. Clinical application of SNP array analysis in first-trimester pregnancy loss: A prospective study //Clinical genetics. – 2017. – V. 91. – №. 6. – P. 849-858.
166. Wang Y. et al. Systematic analysis of copy-number variations associated with early pregnancy loss //Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. – 2020. – V. 55. – №. 1. – P. 96-104.
167. Warren J. E. et al. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation //Obstetrics & Gynecology. – 2009. – V. 114. – №. 5. – P. 1093-1102.

168. Watanabe T. et al. Mild phenotypes associated with an unbalanced X-autosome translocation, 46, X, der (X) t (X; 8)(q28; q13) //Clinical case reports. – 2018. – V. 6. – №. 8. – P. 1561.
169. Westervelt N. et al. Deletion of the XIST promoter from the human inactive X chromosome compromises polycomb heterochromatin maintenance //Chromosoma. – 2021. – V. 130. – №. 2. – P. 177-197.
170. Wen J. et al. Functional consequences of copy number variants in miscarriage //Molecular Cytogenetics. – 2015. – V. 8. – №. 1. – P. 1-9.
171. Xu H. H. et al. Familial 5.29 Mb deletion in chromosome Xq22. 1–q22. 3 with a normal phenotype: a rare pedigree and literature review //BMC Medical Genomics. – 2023. – V. 16. – №. 1. – P. 111.
172. Yamazawa K., Ogata T., Ferguson-Smith A. C. Uniparental disomy and human disease: an overview //American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics. – Hoboken : Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010. – V. 154. – №. 3. – P. 329-334.
173. Zarrei M. et al. A copy number variation map of the human genome //Nature Reviews Genetics. – 2015. – V. 16. – №. 3. – P. 172-183.
174. Zhang L. et al. X-CNV: genome-wide prediction of the pathogenicity of copy number variations //Genome Medicine. – 2021. – V. 13. – №. 1. – P. 1-15.
175. Zhang Y. X. et al. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and arrayCGH //Clinical genetics. – 2009. – V. 75. – №. 2. – P. 133-140.
176. Zhao Y. et al. X Chromosome Inactivation Pattern and Pregnancy Outcome of Female Carriers of Pathogenic Heterozygous X-Linked Deletions //Frontiers in Genetics. – 2021. – V. 12. – P. 782629.
177. Zhu H., Kong L. LncRNA CRNDE regulates trophoblast cell proliferation, invasion, and migration via modulating miR-1277 //American Journal of Translational Research. – 2019. – V. 11. – №. 9. – P. 5905.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 - Спектр SNP в гене *XIST*

ген	SNP	генотип	Частота в общей популяци и
<i>XIST</i>	.	chrX:73829751T>C	8,51E-05
<i>XIST</i>	.	chrX:73829790CAAA>C	0,0004
<i>XIST</i>	.	chrX:73829790CAAA>CA	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73829790CAAA>CAA	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73829790CAAA>CAAAA	.
<i>XIST</i>	rs56046107	chrX:73830436A>G	0,0441
<i>XIST</i>	rs7879153	chrX:73830729A>G	0,0992
<i>XIST</i>	.	chrX:73830844A>AAG	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73830847ACCC>A	.
<i>XIST</i>	rs5902721	chrX:73831444CA>C	0,1178
<i>XIST</i>	.	chrX:73831444CA>CAA	.
<i>XIST</i>	rs66680227	chrX:73831762C>T	0,0441
<i>XIST</i>	.	chrX:73832227G>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832228A>G	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832263G>GT	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832264A>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832266AG>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832271T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832281C>CCA	.
<i>XIST</i>	rs57127587	chrX:73832282TGA>CGA	0,0998
<i>XIST</i>	.	chrX:73832282TGA>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832285G>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832288TG>T	.

Продолжение Таблицы А.1 - Спектр SNP в гене *XIST*

ген	SNP	генотип	Частота в общей популяци и
<i>XIST</i>	.	chrX:73832290C>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73832295T>C	.
<i>XIST</i>	rs372618084	chrX:73832330GA>G	0,0076
<i>XIST</i>	.	chrX:73832330GA>GAA	.
<i>XIST</i>	rs140601809	chrX:73832919G>C	0,0301
<i>XIST</i>	.	chrX:73833005C>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73833006A>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73833013G>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73833015A>G	.
<i>XIST</i>	rs373916914	chrX:73833016G>A	9,23E-06
<i>XIST</i>	.	chrX:73833019C>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73833206G>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73833223A>T	.
<i>XIST</i>	rs1009948	chrX:73833838C>T	0,0993
<i>XIST</i>	.	chrX:73834756C>CAGGCA	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73834806C>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73834807A>G	.
<i>XIST</i>	rs7066064	chrX:73834862C>T	0,1641
<i>XIST</i>	rs761924965	chrX:73834993CA>C	0,0067
<i>XIST</i>	.	chrX:73834993CA>CAAA	.
<i>XIST</i>	rs60156201	chrX:73835489A>C	0,0375
<i>XIST</i>	.	chrX:73835508A>G	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73835517T>C	.
<i>XIST</i>	rs66660863	chrX:73835608T>C	0,0441

Продолжение Таблицы А.1 - Спектр SNP в гене *XIST*

ген	SNP	генотип	Частота в общей популяци и
<i>XIST</i>	rs770376846	chrX:73838333G>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73838347T>G	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73838347T>TGTTATGCAGTAG	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73838349C>CCCA	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73838350T>A	.
<i>XIST</i>	rs7888812	chrX:73838671G>A	0,0983
<i>XIST</i>	rs7891967	chrX:73838672A>T	0,0982
<i>XIST</i>	.	chrX:73839208T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73839222G>T	.
<i>XIST</i>	rs58762853	chrX:73839316A>C	0,0988
<i>XIST</i>	rs67249756	chrX:73839516C>G	0,0993
<i>XIST</i>	.	chrX:73839658T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73839665A>G	.
<i>XIST</i>	rs996453780	chrX:73839931A>T	9,22E-06
<i>XIST</i>	rs67753620	chrX:73839950C>G	0,0993
<i>XIST</i>	rs66511103	chrX:73839980G>T	0,0994
<i>XIST</i>	.	chrX:73840147AT>A	.
<i>XIST</i>	rs67769755	chrX:73840251T>C	0,0994
<i>XIST</i>	rs68043269	chrX:73840316C>G	0,0993
<i>XIST</i>	rs66494893	chrX:73840449G>C	0,0442
<i>XIST</i>	.	chrX:73841244CTA>C	6,49E-05
<i>XIST</i>	.	chrX:73841244CTA>CTATA	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73841246A>*	.

Продолжение Таблицы А.1 - Спектр SNP в гене *XIST*

ген	SNP	генотип	Частота в общей популяци и
<i>XIST</i>	rs147403925	chrX:73841246A>C	0,0321
<i>XIST</i>	.	chrX:73842163T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73842165T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73842355A>G	.
<i>XIST</i>	rs142303653	chrX:73842484G>A	0,017
<i>XIST</i>	rs41310673	chrX:73842859A>T	0,0992
<i>XIST</i>	.	chrX:73842961G>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73842968T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73843266T>C	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73843431A>G	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73843432A>G	.
<i>XIST</i>	rs764890610	chrX:73843455G>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73844063A>G	.
<i>XIST</i>	rs41307246	chrX:73844076T>C	0,0386
<i>XIST</i>	rs1050158724	chrX:73845087G>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73845094C>A	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73845096T>A	.
<i>XIST</i>	rs45483698	chrX:73845100C>T	0,0375
<i>XIST</i>	.	chrX:73845216A>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73845300C>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73845867A>G	.
<i>XIST</i>	rs1894271	chrX:73846604T>C	0,1845
<i>XIST</i>	rs6527	chrX:73847056C>A	0,0996

Окончание Таблицы А.1 - Спектр SNP в гене *XIST*

ген	SNP	генотип	Частота в общей популяци и
<i>XIST</i>	rs778953684	chrX:73847404CTC	0,0094
<i>XIST</i>	rs188837699	chrX:73847717C>A	3,69E-05
<i>XIST</i>	rs6528	chrX:73848738T>C	0,0236
<i>XIST</i>	.	chrX:73848898A>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73848899A>T	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73848910A>G	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73849835ACTGGGGCTAGGGCT GGGGGGTTAGGGGACTGGGGCTGG GGCAGGGCTGGGGCGGGGTGGGAG TAGGG>A	1,20E-05
<i>XIST</i>	.	chrX:73849859G>*	.
<i>XIST</i>	.	chrX:73849859G>A	.
<i>XIST</i>	rs776507815	chrX:73850050A>T	.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю научного руководителя, доктора биологических наук, профессора РАН Лебедева Игоря Николаевича и директора Томского НИМЦ, академика РАН, доктора биологических наук, профессора Степанова Вадима Анатольевича за предоставленную возможность выполнения диссертационной работы. Отдельно выражаю глубокую признательность Игорю Николаевичу Лебедеву за всестороннюю помощь, критические замечания и мудрые советы, а также безграничное терпение на протяжении всего выполнения работы.

Выражаю искреннюю благодарность коллективу лаборатории цитогенетики, лаборатории онтогенетики, лаборатории эволюционной генетики и лаборатории геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за помощь и участие в планировании и проведении исследования, а также обсуждении полученных результатов.

Особую благодарность хочу выразить кандидату биологических наук Екатерине Николаевне Толмачевой за ценные советы, конструктивные замечания и неоценимую помощь на всех этапах работы.

Огромная благодарность врачам Генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за помощь в обследовании пациентов и сборе биологического материала.

Отдельное спасибо врачу-генетику, кандидату медицинских наук Ольге Александровне Салюковой за мудрые советы и моральную поддержку во время выполнения исследования.

Выражаю признательность учёному секретарю диссертационного совета, кандидату биологических наук Ирине Юрьевне Хитринской за методическую помощь в подготовке документов к защите.

Выражаю слова искренней благодарности всем сотрудникам института за участие в обсуждении результатов диссертационной работы на заседаниях ученого совета и в личной беседе.

И искренне и безмерно благодарю свою семью и друзей за понимание, смирение и всестороннюю поддержку на протяжении всей моей сознательной жизни.