

© И. Н. Лебедев,
А. А. Кашеварова, Н. А. Скрябин,
Т. В. Никитина, М. Е. Лопаткина,
А. А. Мельников, Е. А. Саженова,
Т. В. Иванова, И. Д. Евтушенко

ФГБУ «НИИ медицинской генетики»
СО РАМН, г. Томск

МАТРИЧНАЯ СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ (ARRAY-CGH) В ДИАГНОСТИКЕ ХРОМОСОМНОГО ДИСБАЛАНСА И CNV-ПОЛИМОРФИЗМА ПРИ АНЭМБРИОНИИ

УДК: 618.39-021.3-07:575

■ Внедрение современных молекулярно-цитогенетических технологий в исследовательскую и диагностическую практику предоставляет беспрецедентные возможности для высокоразрешающего молекулярного кариотипирования в различных областях клинической цитогенетики. В настоящей работе представлены данные о спектре хромосомного дисбаланса и CNV-полиморфизме при наиболее тяжелой форме нарушений раннего эмбрионального развития (анэмбрионии), полученные с использованием матричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH) на ДНК-микрочипах высокого разрешения. Проведен анализ генного состава участков хромосом, затронутых микроделециями и микродупликациями. Обсуждаются возможности, ограничения и перспективы применения технологии aCGH для идентификации генетических причин потерь беременности на ранних сроках.

■ **Ключевые слова:** анэмбриония; матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH, aCGH); несбалансированные микроструктурные aberrации хромосом; вариации по числу копий крупных блоков повторов ДНК (CNV).

Введение

Проблема потери беременности на ранних сроках остается одной из ключевых в репродуктивной биологии и медицине. В среднем 15–20% клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерывается в течение первого триместра, при этом основной вклад в нарушение начальных этапов внутриутробного развития человека вносят геномные мутации в виде числовых нарушений хромосом — анеуплоидии и полиплоидии [3]. Частота мутаций, выявляемых в материале спонтанных абортосов, обычно составляет 50–60%. В то же время значительное число случаев ранних репродуктивных потерь с наличием у внутриутробно погибшего зародыша нормально-го кариотипа не может быть объяснено с цитогенетических позиций. Именно такие случаи представляют особую проблему в плане медико-генетического консультирования супружеских пар с невынашиванием беременности неясной этиологии.

Принимая во внимание несомненную многофакторную природу спонтанного прерывания беременности, тем не менее имеются веские основания полагать, что некоторая часть хромосомных мутаций остается не выявленной при цитогенетическом обследовании абортосового материала. Три основные методические проблемы стандартного кариотипирования клеток спонтанных абортосов, а именно низкая пролиферативная активность клеточных культур, контаминация культур клетками материнского организма и ограниченная разрешающая возможность световой микроскопии в идентификации микроструктурных aberrаций хромосом, оказывают заметное влияние на эффективность и достоверность цитогенетического анализа при установлении причин невынашивания беременности.

Прошедшее десятилетие ознаменовалось внедрением молекулярно-цитогенетических технологий в решение проблем репродуктивной генетики. Применение методов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и сравнительной геномной гибридизации (CGH) позволило описать новые мутации в клетках спонтанных абортосов, в частности моносомии по ряду аутосом набора, двойные и тройные анеуплоидии, а также продемонстрировало высокий уровень хромосомного мозаицизма [13, 17, 21]. Накопленные знания явились основой наблюдаемого прогресса в пренатальной и преимплантационной цитогенетической диагностике хромосомных болезней.

Следует отметить, что принципиальным моментом при проведении подобных молекулярно-цитогенетических исследований явилась возможность частичного (FISH) или даже полного (CGH) анализа кариотипа на предмет числовых и несбалансированных хромосомных aberrаций без непосред-

ственного приготовления препаратов метафазных хромосом. Совершенствование технологии сравнительной геномной гибридизации в направлении использования ДНК-микрочипов (array-CGH, aCGH) открыло новые перспективы для так называемого молекулярного или виртуального кариотипирования эмбриональных клеток. Основной целью такого анализа является, прежде всего, идентификация микроструктурных aberrаций хромосом (микроделеций и микродупликаций, не выявляемых при стандартном кариотипировании), а также вариаций по числу копий крупных блоков повторов ДНК (Copy Number Variation, CNV), изменчивость которых может быть ассоциирована с нарушением внутриутробного развития. Анализ генного состава участков хромосом, затронутых микроструктурными аномалиями или CNV-полиморфизмом, позволяет приблизиться к идентификации генов, дисбаланс по числу копий которых может оказаться критичным для успешного прохождения ранних этапов эмбрионального развития человека. Заметное в последнее время смещение фокуса в цитогенетических исследованиях от хромосомы к гену, а также ожидаемое внедрение высокопроизводительных технологий полногеномного секвенирования позволяет констатировать появление нового направления в репродуктивной биологии и медицине — репродуктивной цитогеномики.

К настоящему времени уже опубликованы результаты 13 исследований спонтанных абортусов, проведенных с использованием технологии aCGH [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20]. Однако полученные данные характеризуются заметной вариабельностью как в плане изученных групп (спонтанные абортусы с нормальным кариотипом или эмбрионы без предварительного цитогенетического анализа вследствие низкой пролиферативной активности клеток, спонтанные абортусы от пар с привычным невынашиванием беременности), объемов обследованных выборок (от 6 до 103 абортусов), использованных диагностических платформ (ДНК-микрочипы низкой плотности на основе ВАС-библиотек или высокоразрешающие ДНК-микрочипы на основе олигонуклеотидных последовательностей), так и собственно полученных результатов (частота выявленных субмикроскопических хромосомных аномалий в изученных выборках варьирует в широких пределах — от 0 до 55%) [5].

Целью настоящего исследования явился aCGH-анализ случаев анэмбрионии — наиболее тяжелой формы патологии эмбрионального развития, связанной с нарушениями самых ранних этапов дифференцировки внутренней клеточной массы зародыша. Как правило, вклад хромосомных ано-

малий в формирование пустого плодного мешка оказывается самым заметным в ряду от анэмбрионии к неразвивающейся (замершей) беременности и собственно спонтанному абарту. В отмеченных выше молекулярно-цитогенетических исследованиях внутриутробно погибших эмбрионов, проведенных с использованием aCGH, только в двух работах было сообщено об анализе в общей сложности 14 случаев анэмбрионии [15, 19]. Таким образом, данная форма патологии на фоне нарастающего объема информации об исследованиях спонтанных абортусов остается практически неизученной с применением современных высокоразрешающих методов анализа кариотипа.

Материалы и методы

Обследовано 10 спонтанных абортусов, полученных от женщин с диагнозом анэмбрионии. Критериями для постановки диагноза при ультразвуковом обследовании беременных женщин являлись отсутствие сформированного эмбриона в полости плодного мешка и несоответствие размеров плодного мешка ожидаемым размерам на текущем сроке беременности. Срок беременности, определенный по дате последней менструации, варьировал от 6 до 12,5 недели (среднее значение $9,0 \pm 1,9$ нед.), а по результатам ультразвукового обследования — от 3,5 до 11 недель (среднее значение $5,6 \pm 2,2$ нед.). Возраст матерей варьировал от 23 до 37 лет (среднее значение $29,8 \pm 4,7$ лет). Возраст отцов находился в диапазоне от 26 до 43 лет (среднее значение $33,9 \pm 6,0$ лет).

Кариотип спонтанных абортусов был установлен с использованием стандартного метода длительного культивирования тканей плодных оболочек. В случае неудачного культивирования по причине низкой пролиферативной активности клеток *in vitro* препараты метафазных хромосом были получены «прямым» методом из некультивированных ворсин хориона [3]. Все спонтанные абортусы, включенные в настоящее исследование, имели нормальный кариотип — 46, XX (7 случаев) или 46, XY (3 случая).

ДНК для молекулярно-цитогенетического анализа выделяли из ворсин хориона с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции. В качестве контрольного образца для проведения конкурентной сравнительной геномной гибридизации использовалась ДНК из лимфоцитов периферической крови здорового донора мужского пола. Мечение обеих геномных ДНК-библиотек (анализируемой и контрольной) проводилось с использованием набора SureTag Complete DNA Labeling Kit в соответствии с протоколом производителя (Agilent Technologies, США).

Гибридизацию проводили на ДНК-микрочипах высокого разрешения SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 4×180K также в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Agilent Technologies, США). В структуру микрочипа входит 110712 олигонуклеотидных ДНК-мишеней и 59647 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Средняя разрешающая возможность микрочипа составляет 25,3 т. п. н.

Детекция гибридизационных сигналов была проведена на сканере SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, США). Сканированные изображения были обработаны с помощью программы Feature Extraction, версия 10.7.3.1 (Agilent Technologies, США). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения CytoGenomics v.2.5.7.0 (Agilent Technologies, США).

Для исключения доброкачественных полиморфных CNV использовали Базу данных геномных вариантов (Database of Genomic Variants, DGV) [2]. Информация о функциях генов и их связях с наследственными заболеваниями человека была получена из web-ресурсов Gene [1] и OMIM [4].

Результаты исследования

Использование ДНК-микрочипов высокого разрешения позволило идентифицировать в кариотипе 10 спонтанных абортусов с предварительно установленным нормальным кариотипом от 3 до 18 регионов делеций или амплификаций. Общее число выявленных aberrаций составило 95. В общей сложности они захватывали 422 гена.

С целью идентификации потенциальных патогенетически значимых хромосомных aberrаций и затрагиваемых ими генов нами был проведен

анализ наличия выявленных в настоящем исследовании аномалий в Базе данных геномных вариантов (DGV), аккумулирующей информацию о CNV-полиморфизме у здоровых индивидов. В результате из дальнейшего исследования было исключено 43 варианта, присутствующих в DGV. При этом список генов сократился до 284. Далее из анализа были также исключены хромосомные регионы с микроделециями и микродупликациями, не содержащие генных последовательностей. После проведенной фильтрации у 9 из 10 обследованных спонтанных абортусов были выявлены несбалансированные хромосомные aberrации, заслуживающие внимания с точки зрения их возможного влияния на процессы внутриутробного развития (табл. 1).

Случай № 1. Выявлено 4 микроделеции и 1 микродупликация, не зарегистрированные в DGV. Микроделеция 2p21 размером 726 п. н. затрагивала только один ген *SIX3*, продукт которого принадлежит к семейству гомеобоксных транскрипционных факторов и играет роль в формировании глаза. Мутации в данном гене ранее были описаны при голопрозенцефалии 2 типа. Делеция 3q13.31-q13.32 затрагивала ген *LSAMP*, продуктом которого является поверхностный нейрональный гликопротеин, действующий как селективная адгезивная молекула и принимающий участие в формировании специфической межнейрональной сети. Микродупликация 5p35.3 затрагивала 10 генов, 5 из которых принадлежат семейству транскрипционных факторов «цинковые пальцы» — *ZNF354A*, *ZNF354B*, *ZNF879*, *ZNF354* и *ZNF454*. Микроделеция 11q13.2 захватывала 10 генов, среди которых привлекает внимание *TBX10*. Продуктом гена является транскрипционный фак-

Таблица 1

Микроструктурные хромосомные aberrации и CNV-полиморфизм при анэмбрионии

№	Кариотип	Продолжительность развития, анамнез	Число регионов дисбаланса	CNV в DGV	Регионы с CNV, не затрагивающими гены	Микроструктурные хромосомные aberrации	Размер, т. п. н.	Некоторые затрагиваемые гены и некодирующие последовательности
1	46,XX	УЗИ: 5 нед. Mens: 9 нед. 2 беременности: 1 ребенок	8	3	0	del2p21	0,726	<i>SIX3</i>
						del3q13.31-q13.32	2032	<i>LSAMP</i> , <i>LOC285194</i>
						dup5q35.3	957	10 генов (<i>ZNF345A</i> , <i>ZNF345B</i> , <i>ZNF879</i> , <i>ZNF354</i> , <i>ZNF454</i> и др.)
						del11q13.2 (dup есть в DGV)	170	10 генов (<i>TBX10</i> , <i>GSTP1</i> , <i>CDK2AP2</i> , <i>CABP2</i> и др.)
						del20q13.32	218	<i>STX16</i> , <i>GNASAS1</i> , <i>hsa-mir-296</i> , <i>hsa-mir-298</i> , <i>NREPL1</i> , <i>GNAS</i>

Таблица 1 (окончание)

№	Карио-тип	Продолжи-тельность раз-вития, анамнез	Число регионов дисбаланса	CNV в DGV	Регионы с CNV, не затрагивающими гены	Микроструктурные хромосомные aberrации	Размер, т. п. н.	Некоторые затрагиваемые гены и некодирующие последовательности
2	46,XX	УЗИ: 11 нед. Mens: 11 нед. 7 беремен-ностей: 1 ребенок, 6 МА	18	6	7 (del3p22.3, del3q13.13, del4q13.1, del4q13.2, del7q31.33, del13q21.33, del18q22)	del2p21	0,726	SIX3
						del6q22.31	37	TRDN
						del10q21.3	1387	CTNNA3
						del12q15-q21.1	435	PTPRR, TSPAN8
						del20q13.32	220	STX16, GNASAS1, hsa-mir-296, has-mir-298, NREPL1, GNAS
3	46,XX	УЗИ: н.д. Mens 12,5 нед. 1-я беремен-ность	3	2	0	del18q12.2-q12.3	1143	LOC647946, has-mir-924
4	46,XY	УЗИ: 6,5 нед. Mens: 8,5 нед. 2 беремен-ности: 1 ребенок	8	7	0	del7p22.2	53	SDK1
5	46,XY	УЗИ: 5,5 нед. Mens: 6 нед. 4 беремен-ности: 1 ребенок, 1 ребенок с пороками развития, 1 МА	10	3	1 (del4q13.1)	del4p12	1369	GABRG1, GABRA2, GABRA4, COX7B2, GABRB1
						del4q13.1-q13.2	2124	TECRL, LOC401134, EPHA5, LOC100144602
						del7q21.11	1781	SEMA3D
						del8q24.13	92	FERIL6
						del10q21.3	1387	CTNNA3
						del17q21.33-q22	1646	CA10, LOC100506650
6	46,XX	УЗИ: 4,5 нед. Mens: 8 нед. 3 беремен-ности: все АЭ	12	4	5 (del3q13.13, del4q13.1, del5q23.2, del7q31.33, del13q21.33)	del4p16.3-p15.2	26714	191 ген
						del4q22 (dup есть в DGV)	230	GRID2
						dup11p15.1	310	PLEKHA7, OR7E14P, RPS13, PIK3C2A
7	46,XX	УЗИ: 3,5 нед. Mens: 8,5 нед. 2 беремен-ности: 1 ребенок	10	6	3 (del3p22.3, del4q13.1, del14q21.1-q21.2)	dup2q23.1	323	MBD5
8	46,XY	УЗИ: 5 нед. Mens: 7,3 нед. 2 беремен-ности: 1 МА	5	4	1 (del2q32.3)	—	—	—
9	46,XX	УЗИ: 5 нед. Mens: 10 нед. 2 беремен-ности: 1 МА	13	4	6 (del3p22.3, del3q13.13, del4q13.1, del5q23.2, del7q31.33, del13q21.33)	del4q13.1-q13.2	2175	TECRL, LOC401134, EPHA5, LOC100144602, hsa-mir-1269
						del8p22	188	TUSC3
						del17q21.33-q22	1628	CA10, LOC100506650
						del6p25.3	197	DUSP22, IRF4
10	46,XX	УЗИ: 5 нед. Mens: 9,5 нед. 2 беремен-ности: 1 ребенок	9	4	3 (del4q13.1, del13q21.33, del14q21.1-q21.2)	del18p11.32-p11.31	5154	30 генов (THOC1, ADCYAP1 и др.)

Примечание: АЭ — анэмбриония; МА — медицинский аборт; жирным шрифтом выделены хромосомные aberrации в некодирующих и кодирующих участках и затрагиваемые гены, зарегистрированные более чем у одного зародыша

тор семейства T-box. Эти транскрипционные факторы играют важную роль в регуляции различных процессов развития, включая раннюю дифференцировку эмбриональных клеток и органогенез. Следует отметить, что микроудупликация данного хромосомного субсегмента, в отличие от выявленной нами микроделеции, присутствует в DGV. Наконец, еще одна микроделеция — del20p13.32, затрагивала ген *STX16* (вовлечен в формирование специфических синаптических взаимодействий) и ген аминопептидазы *NPEPL1*, а также импринтированный ген *GNAS* и антисмысловой РНК-транскрипт *GNASAS1*. Кроме того, в данном регионе локализованы последовательности двух микро-РНК — has-mir-296 и has-mir-298, причем первая из них является регулятором известного транскрипционного фактора NANOG, вовлеченного в поддержание плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток.

Случай № 2. Выявлено 5 микроделеций, при этом две из них — del2p21 и del20q13.32 по размеру и локализации совпали с описанными выше абберациями у зародыша № 1. Еще одна микроделеция del10q21.3 размером 1,387 м.п.н. была также зарегистрирована у зародыша № 5. Данная микроделеция затрагивала единственный ген — *CTNNA3*, продуктом которого является $\alpha 3$ -катенин, ассоциированный с семейством белков кадхеринов, вовлеченных в формирование межклеточных взаимодействий.

Случай № 3. Выявлена микроделеция 18q12.2-q12.3 размером 1,143 м.п.н. В пределах данного хромосомного участка локализована некодирующая последовательность длинной межгенной РНК 669 (LOC647946), а также микро-РНК has-mir-924 с неизвестной функцией.

Случай № 4. Идентифицирована микроделеция 7p22.2 размером 53 т.п.н, затрагивающая единственный ген — *SDK1*. Продуктом данного гена является поверхностный адгезионный белок, связь которого с нарушением внутриутробного развития неочевидна. В литературе имеются данные о вовлеченности этого гена в патогенез гломерулосклероза и ВИЧ-ассоциированной нефропатии, а также об ассоциации его полиморфных вариантов с гипертензией.

Случай № 5. Выявлено 6 микроделеций, 5 из которых являются достаточно протяженными с размером от 1,3 до 2,1 м.п.н. Делеция 4p12 затрагивает 5 генов, причем 4 из них (*GABRG1*, *GABRA2*, *GABRA4* и *GABRB1*) принадлежат к семейству рецепторов гамма-аминомасляной кислоты — основного ингибиторного нейротрансмиттера в центральной нервной системе. Продуктом еще одного гена (*COX7B2*) является субъединица митохондриальной цитохром С-оксидазы.

Делеция 4q13.1-q13.2 затрагивает 4 гена, среди которых привлекает внимание *EPHA5*. Продуктом геном является белок субсемейства рецепторов эфрина с тирозин-киназными свойствами. Данный белок вовлечен в обеспечение процессов развития, особенно нервной системы. В регуляцию развития центральной нервной системы и головного мозга вовлечены по меньшей мере еще два гена — семафорин 3D (*SEMA3D*) и *CA10*, затрагиваемые микроделециями 7q21.11 и 17q21.33-q22 соответственно.

В целом, обращает на себя внимание тот факт, что большинство отмеченных генов вовлечены в формирование мозга и центральной нервной системы. Второй момент — это наличие множества относительно протяженных делеций. В связи с этим встает вопрос о родительском происхождении данных аббераций. Обследование кариотипа супругов в данной семье на предмет носительства обнаруженных микроструктурных хромосомных аномалий представляется также весьма актуальным вследствие наличия в анамнезе ребенка с пороками развития.

Случай № 6. Выявлена крупная делеция 4p16.3-p15.2 размером 26,7 м.п.н. (рис. 1а), соответствующая региону микроделеционного синдрома Вольф-Хиршхорна. Делеция затрагивает 191 ген. Еще одна делеция на хромосоме 4 (del4q22) затрагивает единственный ген — *GRID2*, продуктом которого является рецептор глутамата в головном мозгу млекопитающих. Наконец, абберация — dup11p15.1 затрагивает 4 гена, среди которых имеется *PIK3C2A*. Продуктом данного гена является протеинкиназа, вовлеченная в сигнальные пути, регулирующие клеточную пролиферацию, миграцию и внутриклеточный транспорт белков. Важно отметить, что в данной семье было отмечено 3 случая анэмбрионии, включая настоящий, при отсутствии живорожденных детей. Наличие делеций на хромосоме 4 и отягощенного акушерского анамнеза позволяет предполагать существование структурной абберации в кариотипе супругов и требует проведения дополнительного цитогенетического обследования.

Случай № 7. Выявлена микроудупликация 2q23.1, затрагивающая единственный ген семейства метилцитозин-связывающих белков (*MBD5*), участвующих в регуляции эпигенетической организации хроматина и экспрессии генов. Интересно, что делеция 2q23.1 соответствует одноименному микроделеционному синдрому, сопровождающемуся умственной отсталостью и рядом дисморфических признаков (номер в Каталоге наследственных болезней МакКьюсика — 156200) [4]. Важно отметить, что, по данным ультразвукового обследования, развитие эмбриона в обследованном нами случае прекратилось на очень

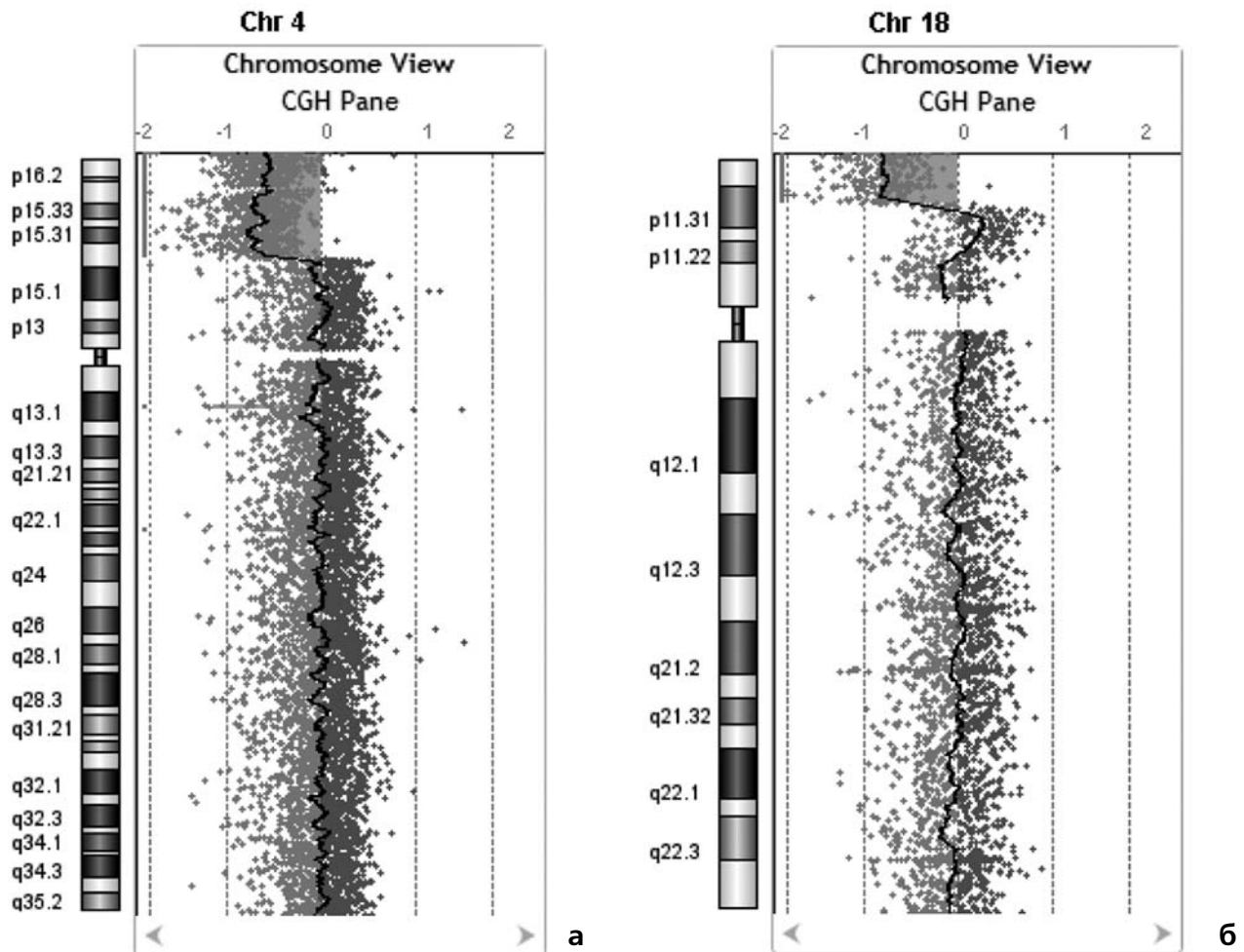


Рис. 1. Хромосомные aberrации в материале эмбрионов, детектированные с помощью aCGH: а) делеция 4p16.3-p15.2, размер 26,7 м. п. н. (случай № 6); б) делеция 18p11.32-p11.31, размер 5,1 м. п. н. (случай № 9)

ранних сроках (3,5 недели). Кроме того, предыдущая беременность в данной семье закончилась мертворождением.

Случай № 8. Выявлены 3 микроделеции, причем две из них (del4q13.1-q13.2 и del17q21.33-q22) перекрывались с aberrациями, выявленными у эмбриона № 5. Еще одна микроделеция 8p22 затрагивала единственный ген — *TUSC3*, являющийся кандидатным опухолесупрессорным геном, экспрессирующимся в легком, печени, толстом кишечнике, простате. Гомозиготные делеции, затрагивающие данный ген, описаны при метастатическом раке простаты.

Случай № 9. Выявлено 2 делеции. Одна из них — del6p25.3 — затрагивала два гена — *DUSP22* и *IRF4*. Продуктом первого является регулятор рецептора эстрогена, а второго — транскрипционный фактор, регулятор интерферон-зависимых генов. Крупная делеция 18p11.32-p11.31 (рис. 1б) размером 5,153 м. п. н. захватывала 30 генов. Среди них привлекают внимание ген *THOC1*, мутации которого приво-

дят к остановке развития в период имплантации, и *ADCYAP1* — продукт которого вовлечен в регуляцию имплантации бластоцисты, контроль физиологических функций плаценты в период беременности и регуляцию роста плода.

Обсуждение

Полученные результаты молекулярно-цитогенетического обследования случаев ранней эмбриональной гибели с использованием технологии aCGH представляют интерес с нескольких позиций. Прежде всего, обращает на себя внимание высокая частота микроделеций и микродупликаций хромосомных регионов, выявленных практически в каждом обследованном случае. Даже после исключения вариантов, зарегистрированных в DGV, эта частота оказывается весьма заметной — у 9 из 10 обследованных спонтанных абортусов (т.е. в 90% случаев) выявлены микроструктурные aberrации хромосом. Это превышает опубликованные в литературе данные, где аналогичный показатель находится в диапазоне от 0 до 55%.

Несколько факторов могут, на наш взгляд, объяснить наблюдаемое явление. Во-первых, это специфика обследованной группы — анэмбрионии с очень ранней остановкой развития зародыша. Вклад хромосомных аномалий в этиологию анэмбрионий, как правило, заметно выше по сравнению с неразвивающимися беременностями и собственно спонтанными абортами. В большинстве опубликованных работ, проведенных с использованием аCGH, акцента на морфологической характеристике обследованного абортивного материала не делалось. Только в двух исследованиях такой анализ был проведен, и было отмечено наличие в выборках в общей сложности 14 случаев анэмбрионий [15, 19]. В одной работе при изучении 11 случаев анэмбрионии с помощью аCGH были выявлены исключительно числовые нарушения хромосом — два случая трисомии 16, трисомия 15, мозаичный кариотип 45, X/46, XY и триплоидия 69, XXX [15]. В другом исследовании среди трех обследованных абортусов один имел *de novo* микродупликацию 10p15.3 размером 199 т.п.н. Аберрация затрагивала 4 гена, среди которых привлекает внимание *WDR37*. Продукт данного гена вовлечен в широкий спектр эссенциальных биологических процессов, таких как трансдукция сигналов, регуляция транскрипции, апоптоза, клеточного цикла и везикулярного транспорта. Второй абортус имел микроделецию 1q25.3 (48 т.п.н.) материнского происхождения и микродупликацию Xq28 (171 т.п.н.), наследованную от отца. Из затрагиваемых генов интересны *STX6* и *ZNFI85*, поскольку представители данных генных семейств были затронуты микроструктурными аберрациями и в нашем исследовании. Наконец, еще в одном случае анэмбрионии хромосомных нарушений выявлено не было [19].

Необходимо также принимать во внимание использование в проведенном нами исследовании ДНК-микрочипов высокого разрешения (180K), позволяющих выявлять большее количество микроструктурных перестроек, по сравнению с микрочипами на основе ВАС-клонов. В то же время в литературе есть работы с использованием чипов большей плотности (244K), не продемонстрировавших, однако, заметного увеличения частоты регистрируемых аберраций кариотипа на фоне других исследований.

Кроме того, нельзя исключить и того факта, что выявленные в нашей работе некоторые аберрации могут оказаться популяционно-специфичными CNV-полиморфизмами. Исследования с использованием технологии аCGH только начинают проводиться в отечественных лабораториях. Неудивительно, что информация о CNV-полиморфизме в различных российских

популяциях пока отсутствует в DGV. В связи с этим остро встают вопросы о накоплении национальных популяционно-специфичных данных об этом типе изменчивости генома человека и об их интеграции в мировые базы данных, что чрезвычайно важно для корректной интерпретации результатов научных и диагностических исследований.

Очевидно, что полученные нами на весьма ограниченной выборке результаты требуют валидации в дополнительных исследованиях. Вместе с тем представляет интерес сопоставление обнаруженных аберраций с опубликованными данными других исследований. В настоящее время в мире с помощью аCGH обследовано 596 спонтанных абортусов [5]. Среди выявленных аберраций обращает на себя внимание микродупликация 18p11.31 размером 502 т.п.н. [18]. В нашем исследовании была зарегистрирована протяженная делеция 18p11.32-p11.31 (случай № 10), также затрагивающая данный субсегмент хромосомы 18. Еще одна интересная мутация — микроделеция 10q21.3, выявленная дважды в нашем исследовании и в работе Rajcan-Separovic с коллегами [20]. В обоих наших случаях размер делеции составил 1,387 м.п.н., тогда как в другом исследовании — только 72 т.п.н., причем делеция была унаследована от матери. Интересно, что все делеции затрагивали единственный ген — *CTNNA3*, который является импринтированным и экспрессируется в плаценте только с хромосомы материнского происхождения [20]. Еще один момент связан с наличием одинаковых аберраций у нескольких абортусов даже в пределах одного нашего исследования. Следует отметить, что все они были представлены микроделециями, а не микродупликациями, в том числе и в не кодирующих областях (таблица). Очевидно, что необходимо расширение выборок для анализа патогенетической значимости выявленного хромосомного дисбаланса, а также для исключения популяционно-специфичного CNV-полиморфизма.

Представляет интерес для дальнейшего исследования и спектр генов, затрагиваемых микроструктурными аберрациями хромосом. Любопытно, что большинство отмеченных нами таких генов оказались вовлеченными в формирование головного мозга и в обеспечение функций центральной нервной системы. Отражает ли это сложность генетического контроля развития мозга или указывает на плейотропные эффекты генов, пока остается неясным. Следующей по частоте встречаемости оказалась группа генов, принадлежащих к различным семействам транскрипционных факторов. Несомненно, что становится актуальным анализ функциональной и онтогене-

тической значимости CNV как потенциального объекта естественного отбора. Небезынтересно также исследование aberrаций в участках, не содержащих известных кодирующих последовательностей, но которые вполне могут оказаться важными регуляторными элементами генома. Перспектива таких фундаментальных исследований просматривается с использованием высокопроизводительных технологий секвенирования нового поколения.

С практической точки зрения представляется актуальным анализ происхождения микроструктурных хромосомных aberrаций. И если мутации *de novo* не вызывают особых проблем с интерпретацией их фенотипических эффектов, то доказательство наследования микроструктурной aberrации от родителей поднимает ряд серьезных дискуссионных теоретических и практических вопросов, на которые пока нет однозначных ответов. Являются ли такие мутации действительной причиной ранней эмбриональной гибели, если они присутствуют в кариотипе взрослых индивидов? Насколько стабильны они при прохождении через мейоз и не приводят ли к появлению дополнительных микроструктурных изменений хромосом? Не оказывают ли влияния на фенотипическое проявление таких мутаций эффекты геномного импринтинга?

Так или иначе в настоящее время мы находимся в периоде накопления данных о роли новой формы изменчивости генома человека (CNV) в этиологии ранних репродуктивных потерь и невынашивания беременности. Исследования в этом направлении представляются чрезвычайно актуальными и позволяют надеяться на получение новых знаний об особенностях организации и функционирования генома в ходе онтогенеза.

Настоящее исследование выполнено при поддержке грантов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» № 8276 и 8720.

Литература

1. База данных «Gene». URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Дата обращения 05.04.2013).
2. База данных геномных вариантов (DGV). URL: <http://projects.tcag.ca/variation> (Дата обращения 05.04.2013).
3. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. — СПб.: Издательство Н-Л, 2007. — 640 с.
4. Каталог наследственных болезней человека МакКьюсика (OMIM). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (Дата обращения 05.04.2013).
5. Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности / Никитина Т. В. [и др.] // Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, № 1. — С. 26–35.
6. Array comparative genomic hybridization analysis in first — trimester spontaneous abortions with «normal» karyotypes / Shimokawa O. [et al.] // Am. J. Med. Genet. — 2006. — Vol. 140. — P. 1931–1935.
7. Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples / Menten B. [et al.] // BMC Med. Genet. — 2009. — Vol. 14. — P. 89–93.
8. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation / Warren J. E. [et al.] // Obstet. Gynecol. — 2009. — Vol. 114. — P. 1093–1102.
9. Array comparative genomic hybridization profiling of first — trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro / Benkhalifa M. [et al.] // Prenat. Diagn. — 2005. — Vol. 25. — P. 894–900.
10. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion / Gao J. [et al.] // Mol. Cytogenet. — 2012. — Vol. 16, N 5.
11. Array-CGH testing in spontaneous abortions with normal karyotypes / Borovik C. L. [et al.] // Genet. Mol. Biol. — 2008. — Vol. 31. — N 2. — P. 416–422.
12. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages / Schaeffer A. J. [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 74. — P. 1168–1174.
13. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH) — Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions / Fritz B. [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 9. — P. 539–547.
14. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss / Robberecht C. [et al.] // Prenat. Diagn. — 2012. — Vol. 4. — P. 1–10.
15. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls / Robberecht C. [et al.] // Genet. Med. — 2009. — Vol. 11. — P. 646–654.
16. Evaluation of array comparative genomic hybridization for genetic analysis of chorionic villus sampling from pregnancy loss in comparison to karyotyping and multiplex ligation-dependent probe amplification / Deshpande M. [et al.] // Genet. Test. Mol. Biomarkers. — 2010. — Vol. 14, N 3. — P. 421–424.
17. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis / Lebedev I. N. [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 12, N 7. — P. 513–520.
18. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and array CGH / Zhang Y. X. [et al.] // Clin. Genet. — 2009. — Vol. 75. — P. 133–140.
19. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects / Rajcan-Separovic E. [et al.] // Mol. Hum. Reprod. — 2010. — Vol. 16. — P. 125–134.
20. Identification of copy number variants in miscarriage from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss / Rajcan-Separovic E. [et al.] // Hum. Reprod. — 2010. — Vol. 25. — P. 2913–2922.

21. *Lebedev I. N.* Mosaic aneuploidy in early fetal losses // *Cytogenet. Genome Res.* — 2011. — Vol. 133, N 2–4. — P. 169–183.

Статья представлена В. С. Барановым,
ФГБУ «НИИAG им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

ARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION
(ARRAY-CGH) IN ANALYSIS OF CHROMOSOMAL
ABERRATIONS AND CNV IN BLIGHTED OVUM PREGNANCIES

Lebedev I. N., Kashevarova A. A., Skryabin N. A.,
Nikitina T. V., Lopatkina M. E., Melnikov A. A.,
Sazhenova Ye. A., Ivanova T. V., Yevtushenko I. D.

■ **Summary:** Application of modern molecular cytogenetic technologies in research and clinical practice provides unprecedented possibilities for high resolution molecular karyotyping in different areas of clinical cytogenetics. In this study the oligonucleotide-based array-CGH data about unbalanced chromosomal aberrations and copy number variations (CNV) in blighted ovum pregnancies are presented. Analysis of genes content of involved chromosomal regions was done. Scopes, perspectives and limitations of aCGH application into analysis of early pregnancy losses are discussed.

■ **Key words:** blighted ovum; array-based comparative genomic hybridization (aCGH); unbalanced chromosomal aberrations; copy number variation (CNV).

■ Адреса авторов для переписки

Лебедев Игорь Николаевич — д. б. н., руководитель лаборатории цитогенетики ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск; доцент кафедры медицинской генетики ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Россия, Томск.
E-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru.

Lebedev Igor Nikolayevich — Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS, Tomsk, Associate professor of Chair of Medical Genetics, Siberian State Medical University. Tomsk, Russia.
E-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru.

Кашеварова Анна Александровна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Россия, Томск. **E-mail:** anna.kashevarova@medgenetics.ru.

Kashevarova Anna Aleksandrovna — PhD, researcher of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS. Tomsk, Russia.
E-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru.

Скрябин Николай Алексеевич — к. м. н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Россия, Томск. **E-mail:** skryabinn@mail.ru.

Skryabin Nikolay Alekseyevich — PhD, researcher of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS. Tomsk, Russia.
E-mail: skryabinn@mail.ru.

Никитина Татьяна Владимировна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Россия, Томск. **E-mail:** tatyana.nikitina@medgenetics.ru.

Nikitina Tatyana Vladimirovna — PhD, researcher of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS. Tomsk, Russia.
E-mail: tatyana.nikitina@medgenetics.ru.

Лопаткина Мария Евгеньевна — аспирант ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Россия, Томск.

Lopatkina Mariya Yevgenyevna — PhD student of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS. Tomsk, Russia.

Мельников Александр Александрович — аспирант ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Россия, Томск.
E-mail: genetic87@sibmail.com.

Melnikov Aleksandr Aleksandrovich — PhD student of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS. Tomsk, Russia.
E-mail: genetic87@sibmail.com.

Саженова Елена Александровна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. Россия, Томск. **E-mail:** elena.sazhenova@medgenetics.ru.

Sazhenova Yelena Aleksandrovna — PhD, researcher of Laboratory of Cytogenetics, Institute of Medical Genetics SB RAMS. Tomsk, Russia.
E-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru.

Иванова Татьяна Васильевна — к. м. н., доцент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Россия, Томск. **E-mail:** itv7@yandex.ru.

Ivanova Tatyana Vasilyevna — PhD, Associate professor of Chair of Obstetrics and Gynecology, Siberian State Medical University. Tomsk, Russia. **E-mail:** itv7@yandex.ru.

Евтушенко Ирина Дмитриевна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Россия, Томск.
E-mail: evtushenko_id@mail.ru.

Yevtushenko Irina Dmitriyevna — MD, Professor, Head of Chair of Obstetrics and Gynecology, Siberian State Medical University. Tomsk, Russia. **E-mail:** evtushenko_id@mail.ru.