Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Биологический факультет
Кафедра цитологии и генетики

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
д-р биол. наук
_____ Д. С. Воробьёв
« 14 » 06 2019 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

АНАЛИЗ CNVs У ЖЕНЩИН С ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ СМЕЩЕНИЕМ ИНАКТИВАЦИИ Х-ХРОМОСОМЫ И НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки
06.03.01 – Биология

Бабай Татьяна Сергеевна

Руководитель ВКР
канд. биол. наук
_____ Е. Н. Толмачёва
подпись
« 14 » 06 2019 г.

Автор работы
студент группы № 01501
_____ Т. С. Бабай
подпись

Томск–2019

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ 3
ВВЕДЕНИЕ 5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 8
1.1 Инактивация Х-хромосомы и ее типы 8
1.2 Связь асимметричной инактивации Х-хромосомы с патологиями у человека 12
1.3 Вариации числа копий участков ДНК (CNVs) 14
1.4 Роль CNVs в этиологии ранних репродуктивных потерь 16
2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ 24
2.1 Материал исследования 24
2.2 Выделение ДНК из крови микрометодом 24
2.3 Гидролиз ДНК метилчувствительной эндонуклеазой Hpa II 25
2.4 Амплификация локуса *AR* Х-хромосомы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) 25
2.5 Анализ статуса инактивации с помощью капиллярного электрофореза 26
2.6 Матричная сравнительная геномная гибридизация 26
2.6.1 Подготовка геномной ДНК 26
2.6.2 Энзиматическое мечение образцов ДНК 27
2.6.3 Очистка меченых образцов ДНК 27
2.6.4 Подготовка меченной ДНК к гибридизации 28
2.6.5 Гибридизация и отмывка 28
2.7 Классификация обнаруженных CNVs 29
2.8 Анализ обогащения 29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 31
ВЫВОДЫ 37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 38

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

aCGH (array comparative genomic hybridization) – матричная сравнительная геномная гибридизация;

AR (син. *HUMARA*) – ген рецептора андрогена (Androgene receptor);

CNV (copy number variation) – вариация числа копий участков ДНК;

DGV (Database of Genomic Variants) – База данных геномных вариантов;

DECIPHER (Database of genomic variation and phenotype in humans using Ensembl resources) – База данных геномных вариантов и фенотипа у человека с использованием ресурсов Ensembl;

dNTP – дезоксирибонуклеотид фосфат;

EDTA – этилендиаминтетраацетат;

FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) – флуоресцентная гибридизация *in situ*;

GO – Gene Ontology;

GSEA (gene set enrichment analysis,) – анализ обогащения по функциональной принадлежности;

LINE (Long Interspersed Nuclear Element) – длинный диспергированный ядерный элемент;

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – онлайн-каталог менделевской наследственности у человека;

SDS – додецилсульфат натрия;

sXCI – смещенная XCI;

TSIX – репрессор гена *XIST*;

XACT (X-active coating transcript) – X-активирующий покрывающий транскрипт;

Xa – активная X-хромосома;

XCI – инактивация X-хромосомы;

Xi – инактивированная X-хромосома;

XIC (X-chromosome inactivation center) – центр инактивации X-хромосомы;

XIST – X-инактивирующий специфичный транскрипт;

Xm – X-хромосома материнского происхождения;

Xp – X-хромосома отцовского происхождения;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

п. н. – пара нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПНБ – привычное невынашивание беременности;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СА – спонтанный абортус;

ВВЕДЕНИЕ

Невынашивание беременности является одной из ключевых проблем современной репродуктивной биологии человека и медицины. По разным оценкам, от 15 до 25 % клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерывается на сроке до 16 недель (Macklon N. S. et al., 2002, Радзинский В. Е. и др, 2015). Причины остановки развития эмбрионов имеют многофакторную природу, однако ключевая роль в этиологии ранних репродуктивных потерь отводится генетическим факторам (Лебедев И. Н. и др., 2013). Известно, что около половины зародышей имеют числовые и структурные аномалии хромосомного набора (Griffin D. K., 1996). Причины гибели оставшейся значительной части эмбрионов, для которых с помощью стандартных цитогенетических методов был определен нормальный кариотип, часто остаются неясными. Ряд исследований указывает на то, что определенную роль в этом процессе играют нарушения эпигенетических систем реализации наследственной информации. Одним из таких процессов, влияющих на способность женщины выносить ребенка, является инактивация Х-хромосомы

Инактивация Х-хромосомы (XCI) – эпигенетический процесс, при котором репрессируется одна из двух Х-хромосом клеток женского организма – необходима для компенсации дозы Х-сцепленных генов. Для человека характерна равновероятная XCI, когда каждый из гомологов инактивируется примерно в 50 % клеток организма.

Процесс инактивации Х-хромосомы происходит еще до имплантации, когда бластоциста имеет небольшие размеры. Большинство соматических тканей являются производными 15–20 клеток предшественников, из которых и состоит эпибласт, а в малоклеточных бластоцистах клеток предшественников соответственно еще меньше.

Об ассиметричной инактивации Х-хромосомы (Skewed X-chromosome inactiva-tion – sXCI) говорят в том случае, когда наблюдается смещение преимущества инактивации (> 80 %) в сторону одной из родительских хромосом, а случаи, когда активной остается менее 10 % Х-хромосом одного из родителей, считаются экстремальным смещением. В нормальной популяции смещенная инактивация Х-хромосомы встречается у 1,5–7 % здоровых женщин, тогда как у женщин с невынашиванием беременности частота sXCI может достигать 16-17 % (Sui Y. et al., 2015).

sXCI может быть результатом первичной неслучайной инактивации, как например мутации в промоторе гена *XIST*, ключевого для процесса инактивации (Plenge R. M. et al., 1997), однако такие мутации очень редки. Другой вариант – появление вторичной асимметрией в следствие селекции клеточных клонов, несущих какие-либо мутации на активной Х-хромосоме, от внутригенных до микроструктурных аберраций, влияющих на

жизнеспособность клетки (Толмачева Е. Н. и др., 2009). Процесс инактивации Х-хромосомы запускается на ранних этапах развития. У человека накопление транскриптов гена *XIST* зафиксировано уже 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, в части бластомеров с хромосомными мутациями, такими, например, как моносомии, может запускаться процесс апоптоза и пул бластомеров уменьшается. Смещение инактивации Х-хромосомы в этом случае имеет стохастический характер и возникает из-за компартментализации бластомеров при раннем развитии.

Вариация числа копий (Copy number variation, CNV) — вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов размером от 1 тыс. до нескольких млн. пар нуклеотидов. Сведения о CNVs, как о новом уровне соматической структурной вариабельности генома, стали накапливаться в литературе с развитием высокоразрешающих молекулярно-цитогенетических технологий. CNVs возникают в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. Более 41 % CNVs перекрываются с известными генами, что позволяет выдвинуть предположение о возможной важной роли данного типа структурной вариабельности генома в регуляции экспрессии генов.

В результате недавно проведенного геномного анализа 44 пациентов с ПНБ была показана положительная корреляция между количеством CNVs и увеличением числа выкидышей (Karim et al., 2017).

Таким образом целью данного исследования являлось выявление CNVs, потенциально связанных с гибелью эмбрионов, у женщин с невынашиванием беременности и экстремальным смещением инактивации Х-хромосомы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определение характера инактивации Х-хромосомы в выборке и установление связи между ним и эмбриолетальностью;
2. Выявление вариаций числа копий участков ДНК у женщин с невынашиванием беременности и экстремальным sXCI;
3. Анализ кандидатных генов, задействованных в микроперестройках, нарушение дозы которых может быть ассоциировано с невынашиванием беременности;

Работа выполнена на базе НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН в лаборатории цитогенетики под руководством кандидата биологических наук Толмачевой Екатерины Николаевны. Автор

выражает благодарность научному руководителю за помощь при написании выпускной квалификационной работы бакалавра.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Инактивация Х-хромосомы и ее типы

Инактивация Х-хромосомы (X chromosome inactivation, XCI) – это эпигенетический феномен, при помощи которого достигается транскрипционное «молчание» большинства генов на одной из двух Х-хромосом в соматических клетках женского организма. Вследствие Х-инактивации женщины являются мозаиками по двум популяциям клеток, имеющих либо отцовскую, либо материнскую хромосому Х в качестве активной. Явление инактивации Х-хромосомы впервые было описано М. Лайон в 1961 г. (Lyon M. F., 1961). Данный процесс необходим для компенсации дозы Х-сцепленных генов у индивидуумов разного пола у человека и других млекопитающих. Инактивация происходит в раннем эмбриогенезе на стадии восьмиклеточного зародыша, и, установившись однажды, неактивное состояние Х-хромосомы наследуется во всех последующих клеточных поколениях (Van den Berg I. M., 2009). Инактивация является типично эпигенетическим процессом, так как сама последовательность ДНК при этом не изменяется.

С процессом дозовой компенсации генов у млекопитающих связано два РНК-зависимых эффекта – инактивация одной Х-хромосомы при участии *XIST*-РНК и репрессия транскрипции самой *XIST* при участии *TSIX*-РНК на активной Х-хромосоме (Sado T. et al., 2001). Тесная взаимосвязь данных процессов приводит к тому, что в случае не наступления компенсации эмбрион погибает. Это происходит, если обе Х-хромосомы инактивированы или же наоборот остаются активными.

Инициируется процесс инактивации из центра Х-инактивации XIC (X inactivation center), расположенного в локусе Xq13 и функционирующего в цис-положении (Brown C. J. et al., 1991). В этой области Х-хромосомы локализуются гены *XIST* и *TSIX*.

Поддержание активного состояния Х-хромосомы происходит за счет антисмыслового транскрипта гена *TSIX*, что подтверждается в случаях мутаций промоторной области данного гена. Вследствие таких мутаций наблюдается накопление *XIST*-РНК на хромосоме и ее последующая инактивация (Huynh K. D., Lee J. T., 2003). В случае, если Х-хромосома с мутантным промотором гена *TSIX* наследуется от отца, развитие протекает нормально и в организме самок «выключается» исключительно «отцовская» хромосома. Если же поврежденная Х-хромосома наследуется от матери, большинство эмбрионов обоих полов гибнут, так как в этом случае «выключается» единственная Х-хромосома у самцов и обе Х-хромосомы у самок (Okamoto I. et al., 2004). Таким образом, наступление инактивации Х-хромосомы с поврежденным локусом *TSIX* не зависит от кого из родителей, она наследуется. Экспрессия гена *TSIX* на начальных этапах

эмбриогенеза в норме не детектируется. Следовательно, несмотря на то, что ген *TSIX* необходим для поддержания активного состояния Х-хромосомы, он вряд ли отвечает за репрессию гена *XIST* на «материнской» Х-хромосоме в самом начале развития, и должен существовать какой-то другой механизм. В связи с этим были предложены две модели, объясняющие механизм импринтинга.

Согласно одной из моделей, Х-хромосома, наследуемая от отца, находится уже в «выключенном» состоянии (Huynh K. D., Lee J. T., 2003), согласно другой, более вероятной, она быстро инактивируется после активации зиготы, при этом Х-хромосома материнского происхождения не инактивируется, так как её ген *XIST* репрессирован эпигенетически.

Весь процесс инактивации проходит в три этапа: инициация, распространение и поддержание (Heard E. et al., 1997). Ранее считалось, что у человеческого эмбриона процесс инактивации Х-хромосомы не инициируется до имплантации, но позже было показано, что аккумуляция *XIST*-РНК у эмбрионов человека на одной из двух Х-хромосом наблюдается уже на стадии восьмиклеточного зародыша (Van den Berg I. M., 2009). Инициация инактивации Х-хромосомы заключается в сближении районов XIC. Считается, что в этот период происходит взаимоисключающий выбор будущих активной (Xa) и неактивной (Xi) Х-хромосом (Дементьева Е. В., 2012). В это время на обеих хромосомах сохраняется экспрессия гена *TSIX* и блокируется транскрипция гена *XIST* за счет формирования нестабильного комплекса смысловой и антисмысловой РНК обоих генов. Затем на одной из Х-хромосом происходит репрессия гена *TSIX* в результате действия неизвестного аутосомного транс-фактора. Это вызывает активацию гена *XIST*, и его продукт в виде РНК распространяется в обе стороны по всей хромосоме и обеспечивает ее инактивацию (Heard E., Disteche C. M., 2006; Wutz A., Gribnau J., 2007).

В соответствии с одной из теорий, распространение инактивации возможно при наличии конкретных элементов или "way stations" вдоль Х-хромосомы. Предполагают, что "way stations" слабее проявляют свою активность вблизи гена, который блокирует инактивацию. Исследование с помощью FISH показало, что *XIST*-РНК гибридизует дискретные очаги на Х-хромосоме, а не покрывает всю хромосому целиком (Lyon M. F. et al., 1992). Однако в исследованиях с использованием искусственной хромосомы дрожжей, несущей ген *XIST*, показали, что *XIST*-РНК полностью покрывала хромосому без дискретных очагов, и была способна блокировать некоторые гены.

Скорее всего, такими конкретными элементами являются LINE элементы (Lyon M. F. et al., 1992). На данный момент известно два факта, свидетельствующих в пользу данного предположения. Во-первых, как у человека, так и у мыши число LINE-элементов

на Х-хромосоме практически в два раза выше, чем на аутосомах. Во-вторых, LINE-элементы распределены по Х-хромосоме дискретно и неслучайно: наибольшая их плотность характерна для XIC и районов Х-хромосомы, подвергающихся инактивации, в то время как районы Х-хромосомы, избегающие инактивации, имеют низкую плотность (Carrel L., Willard H. E., 2005; Ross M. T. et al., 2005). Не так давно был выявлен еще один ген *XACT* (X-active coating transcript), локализованный в Xq23 в необычно большом межгенном регионе длиной 1,7 Мб (Vallot C. et al., 2013). Этот ген индентифицирован только у приматов и экспрессируется в ранней бластоцисте на активных Х-хромосомах в тот же период, что и ген *XIST* (Vallot C. et al., 2017). Аналога этого гена не было выявлено у мыши. *XACT*-РНК покрывает активную Х-хромосому в плюрипотентных и начинающих дифференцироваться клетках человека, когда XCI еще экстремально динамична. Предполагают, что *XACT*-РНК контролирует распространение *XIST*-РНК по активной Х-хромосоме в течение преимплантационного развития эмбриона (Vallot C. et al., 2015). Может быть, таким образом предотвращается преждевременная инактивация Х-хромосомы у человека в раннем эмбриогенезе.

Поддержание инактивации Х-хромосомы с участием *XIST* осуществляется за счет того, что она сопровождается ковалентными модификациями гистонов. Имеет место деацетилирование гистонов H3 и H4, деметилирование по лизину в 4-м положении гистона H3 и метилирование 9-го и 27-го остатков лизина гистона H3 (Chadwick B. P., Willard H. F., 2003). Механизм, с помощью которого транскрипты *XIST*-РНК приводят к «выключению» соответствующей Х хромосомы, остается все еще недостаточно изученным. Факт накопления транскриптов в большом количестве на инактивируемой Х-хромосоме позволяет предполагать, что, возможно, это способствует привлечению белков, участвующих в гетерохроматинизации Х-хромосомы. В частности, было обнаружено, что белки группы Polycomb локализуются на Х-хромосоме в зависимости от присутствия *XIST*-РНК, но только на самом начальном этапе инактивации (Csankovszki G. et al., 2001). На более позднем этапе инактивации происходит замена гистона H2A на его минорный вариант – macroH2A1, обычно встречающийся в гетерохроматине. Этот процесс также зависит от присутствия *XIST*-РНК (Pirrotta V. et al., 2003). Со временем было подтверждено, что ген *BRCA1* участвует в регуляции экспрессии большого числа Х-сцепленных локусов и может играть роль в поддержании инактивированного состояния Х-хромосомы. Продукт нормального гена связывается с *XIST*-РНК, а мутантный белок *BRCA1* нарушает прикрепление *XIST*-РНК к Х-хромосоме (Толмачева Е. Н. с соавт., 2009). Последним эпигенетическим событием в процессе инактивации является метилирование

ДНК промоторных областей генов, что позволяет стабильно поддерживать неактивное состояние Х-хромосомы (Толмачева Е. Н. с соавт., 2017).

При изучении статуса экспрессии генов Х-хромосомы человека было обнаружено, что 15 % генов избегают инактивации и еще 10 % генов имеют гетерогенную экспрессию, то есть подвергаются инактивации у одних женщин и избегают инактивации у других (Carrel L, Willard H. E., 2005). Возможно, что более высокий уровень экспрессии этих генов у женщин либо отвечает за формирование специфичных для женского пола признаков, либо не играет существенной роли (Disteche C. M., 1995; Brown C. J., 2003).

У млекопитающих выделяют два типа инактивации Х-хромосомы: им-принтированная (избирательная) и стохастическая (случайная, равновероятная).

Импринтированная инактивация зафиксирована у эволюционно более древней группы млекопитающих, а именно у сумчатых. Данный тип инактивации заключается в возникновении в 80 % и более всех клеток преимущественной инактивации Х-хромосомы, унаследованной от отца. Данный тип отмечен и у некоторых плацентарных млекопитающих (у грызунов). Этот феномен фиксируется, начиная со стадии четырехклеточного дробления у мышей. Импринтированная инактивация сохраняется до стадии бластоцисты и поддерживается в дальнейшем в трофоэктодерме и первичной энтодерме, однако во внутренней клеточной массе происходит реактивация отцовской Х-хромосомы, а дальнейшая инактивация носит случайный характер (Van den Berg I. M., 2009). Для человека пока неизвестно имеет ли место первоначально импринтированная инактивация отцовской Х-хромосомы, так же как и у мыши, либо процесс XCI на ранних этапах развития человека сразу про-исходит равновероятно (Толмачева Е. Н. с соавт., 2017). В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что у человека в отличие от мыши, равновероятная инактивация наблюдается во всех тканях, в том числе и в цитотрофобласте, хотя из-за специфичности роста плаценты, некоторые исследователи наблюдают картину сходную с импринтированной инактивацией (Толмачева Е. Н. с соавт., 2011). Дело в том, что плацента развивается неравномерно и представленность клонов от разных предшественников подобна лоскутному одеялу (Толмачева Е. Н. с соавт., 2017).

Случайная инактивация в отличие от импринтированной, стабильно поддерживается в ряду клеточных поколений (Heard E., Disteche C. M., 2006). В результате стахостической инактивации примерно в равной степени инактивируется как отцовская (Хр), так и материнская (Хm) Х-хромосома. Теоретически соотношение инактивированных Хm/Хр выглядит как 50/50, но на практике к равновероятной XCI приравнивают отклонения 60/40 и 70/30 (Толмачева Е. Н. с соавт., 2017).

1.2 Связь асимметричной инактивации Х-хромосомы с патологиями у человека

Об ассиметричной инактивации Х-хромосомы (skewed X-chromosome inactivation – sXCI) говорят в том случае, когда наблюдается смещение преимущества инактивации (>80 %) в сторону одной из родительских хромосом, а случаи, когда активной остается менее 5 % Х-хромосом одного из родителей, считаются экстремальным смещением (Minks J., 2008). В популяции среди здоровых женщин частота sXCI оценивается приблизительно в 3,2 % (Sui Y. et al., 2015), тогда как при различных заболеваниях часто фиксируют рост данной частоты sXCI.

Как уже было сказано выше, процесс инактивации у человека начинается на стадии восьмиклеточного зародыша, при этом инактивация чаще всего носит стохастический характер. После начала работы контрольных точек клеточного цикла в части бластомеров с геномными мутациями, такими как моносомии, запускается апоптоз и пул бластомеров уменьшается. Поэтому смещение XCI может возникнуть случайным образом. При неравномерном делении бластомеров преимущество могут иметь бластомеры с Xi одного из родителей, вследствие чего будет устанавливаться асимметричная XCI. Такой вариант установления инактивации может быть более общим в популяции, чем предполагалось ранее. Данный тип инактивации может приводить к различным результатам. В случае, когда организм не имеет Х-сцепленных мутаций ни на Xm, ни на Xp, sXCI не будет вызывать какие-либо эффекты; если же таковые имеются, то при инактивации хромосомы, несущей мутантный аллель, проявления активности мутантного гена будут сводиться к нулю, при инактивации «здоровой» Х-хромосомы картина наблюдается обратная.

Любое событие, которое уменьшает количество эмбриональных клеток, существующих во время установления инактивации Х-хромосомы, увеличивает вероятность смещения XCI. Уменьшенный размер пула эмбриональных предшественников может быть связан с повторным спонтанным абортом по крайней мере двумя механизмами: 1) остаточные трисомные клетки в ооцитах (у женщин, чье собственное развитие было связано с трисомическим мозаицизмом); 2) плохой рост матки, что привело к уменьшению общего числа первичных яичниковых фолликулов (Freeman et al. 2000; Kline et al. 2000).

К настоящему моменту накопился ряд фактических данных о связи нарушений инактивации Х-хромосомы с различными патологическими состояниями у женщин (Orstavik K. H., 2006). В частности, высокий уровень асимметричной XCI был обнаружен в различных группах женщин с заболеваниями репродуктивной системы: рак молочной

железы и яичников, привычное невынашивание беременности и синдром преждевременного истощения яичников. Также у женщин с sXCI описаны случаи проявления Х-сцепленных моногенных заболеваний, таких как гемофилия, миодистрофия Дюшена, болезнь Фабри, синдром ломкой Х-хромосомы (Migeon B. R., 2007). Кроме перечисленных выше заболеваний сдвиг инактивации является одной из причин различных форм Х-сцепленной умственной отсталости как у девочек с Х-сцепленными доминантными болезнями, так и у матерей-носительниц Х-сцепленных рецессивных мутаций (Plenge R. M. et al., 2002). В настоящее время насчитывается около 202 несиндромальных и синдромальных форм Х-сцепленной умственной отсталости, из них восемь – Х-сцепленные доминантные, в числе которых и синдром Ретта (RTT) (Chiurazzi P. et al., 2001). Известно, что сдвиг Х-инактивации практически всегда наблюдается при таких Х-сцепленных заболеваниях, как адренолейкодистрофия, дефицит HPRT, синдром альфаталасемии и умственной отсталости, врожденный Х-сцепленный дискератоз, синдром Вискотта-Олдрича (Belmont J. W., 1996). Проявления симптомов заболевания варьируют от умеренных до ярко выраженных. Для детей с PHACE-синдромом, заболевания с неясной этиологией, предполагающего наличие сочетанных пороков развития, было показано наличие равновероятной XCI, а их здоровые матери имели асимметричную XCI (Levin J. H., 2007).

Наблюдается существенная корреляция между возрастом и частотой смещения XCI (r = 0,23-0,31). sXCI встречается в гемопоэтических клетках у 4-8 % нормальных новорожденных девочек и у 40 % женщин старше 55 лет. У здоровых женщин степень смещения обычно не превышает 75 % (Bolduc V., 2008), однако у 10-30 % женщин репродуктивного возраста регистрируется sXCI, степень которой существенно увеличивается с возрастом, особенно после 70 лет. Предполагают, что на данный процесс могут влиять два фактора: 1) истощение пула стволовых клеток у пожилых женщин; 2) смещение может возрастать в результате отбора за или против одного или нескольких генов на активной Х-хромосоме. Факт, что у пожилых монозиготных близнецовых пар активной является одна и та же Х-хромосома свидетельствует в пользу второго механизма (Minks J., 2008). Кроме того, возраст-зависимое деметилирование отдельных локусов ДНК также может повлиять на степень sXCI.

Смещение инактивации наблюдалось у 15 % спонтанных абортусов женского пола I триместра беременности (Толмачева Е. Н. с соавт., 2015). До сих пор существуют некоторые спорные мнения о связи sXCI с привычным невынашиванием беременности (ПНБ). Однако результаты последнего мета-анализа, в котором были проанализированы 19 научных работ (Таблица 1), включающих суммарно 1594 образца ДНК женщин с ПНБ

и 1924 образца ДНК женщин с нормально протекающими беременностями и не имеющими в анамнезе спонтанных абортов позволяют выявить некоторые закономерности (Sui Y., 2015). Во-первых, экстремальное sXCI (95 % и выше) связано с повышенным риском (>4 раз) привычного невынашивания, во-вторых, у женщин, имеющих три и более спонтанных абортуса, статистически значимо чаще наблюдается смещение ≥ 90 %, и это является важным фактором для прогноза последующих беременностей у конкретных женщин (Толмачева Е. Н. с соавт., 2017).

Таблица 1 – Мета-анализ результатов исследований по выявлению связи между асимметричной инактивацией Х-хромосомы и привычным невынашиванием беременности, по Sui Y., 2015

Страна	Женщины с ПНБ		Контрольная группа		*p*
	Информативные случаи	Случаи смещения	Информативные случаи	Случаи смещения	
Япония	42	7	36	2	0,12
США	106	7	102	4	0,35
Канада	207	25	7	7	0,17
Корея	45	1	54	5	0,14
Турция	62	11	124	2	0,001
Франция	176	4	440	18	0,25
США	314	27	68	2	0,11
Финляндия	43	2	81	4	0,94
Греция	56	6	55	2	0,15
Тайвань	155	12	151	2	0,007
США	45	2	169	11	0,61
Индия	117	-	224	-	-
Примечание: ПНБ – привычное невынашивание беременности; p – уровень значимости.					

1.3 Вариации числа копий участков ДНК (CNVs)

Вариации числа копий участков ДНК представляют собой сегменты ДНК размером от 1 Кб до нескольких Мб, число копий которых различается в индивидуальных геномах (Усманова Н. М., 2007). Вариации числа копий участков ДНК не являются специфичными исключительно для человека и встречаются в геномах других млекопитающих. Так,

например, Perry с соавторами описали CNVs у шимпанзе (Perry G. H. et al., 2006), Graubert и соавторы в своей работе описали CNVs у мыши (Graubert T. A. et al., 2007), Guryev и др. у крысы (Guryev V. et al., 2008). Кроме того, CNVs были обнаружены в геномах свиньи (Fadista J. et al., 2008) и собаки (Chen W. K. et al., 2009).

На сегодняшний день в Базе данных Геномных Вариантов описано свыше 2,8 млн. CNVs, зарегистрированных у здоровых людей (http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home). Вклад CNVs в изменчивость генома человека сопоставим с таковым у однонуклеотидных полиморфизмов или даже превышает его (Zarrei M. et al., 2015). Проведенные исследования показывают, что CNVs в геноме располагаются не случайным образом и более плотное содержание их отмечается вблизи субтеломерных и перицентромерных регионов (Nguyen D. Q. et al., 2006), также их распределение коррелирует с распределением сегментных дупликаций, экзонов и мобильных генетических элементов, таких как Alu-повторы (Усманова Н. М., 2007).

Механизмы возникновения вариаций числа копий участков ДНК на сегодняшний день остаются дискуссионными. Вероятно, часть CNVs может наследоваться от родителей или возникать в их половых клетках, другая же часть CNVs может формироваться *de novo* в соматических клетках самого эмбриона на ранних этапах развития. Соотношение герминативных и соматических CNVs в онтогенезе человека пока не установлено.

Более 41 % CNVs перекрываются с известными генами, что позволяет выдвинуть предположение о возможной важной роли данного типа структурной вариабельности генома в регуляции экспрессии генов (Iafrate A. J. et al, 2004; Henrichsen et al., 2009; Van den Veyver et al., 2009). При изучении генного состава вариаций и классификации генов, вовлеченных в CNVs, на функциональные группы в соответствии с базой данных Gene Ontology, оказалось, что большинство из них участвует в реализации важных физиологических процессов, таких как механизмы клеточной адгезии, нейрофизиологические процессы, иммунная защита организма, обонятельная рецепция и др. (Redon R. et al., 2006) Некоторые CNVs располагаются вблизи локусов, ассоциированных с различными генетическими синдромами человека или раком, однако, поскольку они регистрируются в геномах здоровых людей, то, по-видимому не являются основной причиной возникновения наследственных заболеваний. Например, Mehdi Zarrei и соавторы описали примерно 100 генов, вариабельность по числу копий которых не приводит к возникновению патологического фенотипа (Zarrei M et al., 2015). Таким образом, точное число заболеваний, обусловленных CNVs, на сегодняшний день неизвестно, однако очевидно, что их число может быть значительным. С этой точки

зрения большой интерес вызывает изучение участков генома, вариабельность по числу копий которых может быть ассоциирована со смещенной инактивацией Х-хромосомы.

1.4 Роль CNVs в этиологии ранних репродуктивных потерь

Одной из основных проблем биомедицинских исследований в данной области является затруднение интерпретации клинической значимости CNVs, что обусловлено существованием как нейтральных вариаций числа копий ДНК, так и патогенетически значимых. Поэтому, при анализе данных матричной сравнительной геномной гибридизации с целью выявления вариаций, ассоциированных с какой-либо патологией, следует подразделять обнаруженные вариации на потенциально нейтральные, потенциально патогенетически значимые и вариации с неизвестной клинической значимостью. Принято считать, что на потенциальную патогенетическую значимость CNVs оказывают влияние происхождение вариации (наследование её от родителей-носителей или возникновение *de novo*), отсутствие или наличие данной вариации у здоровых индивидов, размер вариации, её тип (микроделеция или микродупликация) и генный состав. Полагают, что если вариация числа копий участка ДНК регистрируется как у пациента (абортуса), так и у его здорового родителя, то, скорее всего она фенотипически нейтральна, а если CNV возникает *de novo*, то она может быть связана со становлением 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, следовательно, неактивном или на неметилированном и активном. Кроме того, в случае гетерозиготной вариации числа копий участков ДНК, потенциально могут проявиться рецессивные мутации на другом гомологе, а гомозиготные CNVs у потомков проявляются тяжелее, чем гетерозиготные у родителей. Также не исключено, что патологический фенотип формируется вследствие сочетания нескольких CNVs или, к примеру, сочетания CNV и других генетических вариаций, таких как SNP (Никитина Т. В. и др., 2013).

В двух работах Rajcan-Separovic E. с коллегами, опубликованными в 2010 году, было исследовано родительское происхождение субмикроскопических хромосомных перестроек, обнаруженных у погибших эмбрионов с нормальным кариотипом (Rajcan-Separovic E. et al., 2010). Было показано, что большинство уникальных вариаций числа копий участков ДНК, обнаруженных у спонтанных абортусов, наследуются от кого-либо

из родителей. Авторы считают, что не следует исключать возможное негативное влияние этих вариаций на развитие тканей плаценты или эмбриона вследствие вариабельной экспрессии CNVs, рецессивных мутаций на интактном гомологе и геномного импринтинга. Так, в одной из обсуждаемых работ, в семье с привычным невынашиванием беременности у трёх погибших эмбрионов, у которых наблюдались аномалии развития плаценты, была обнаружена унаследованная от матери CNV, затрагивающая ген *TIMP2,* импринтированный в плаценте. Полагают, что *TIMP2* экспрессируется с материнского гомолога, и кодирует тканевой ингибитор металлопротеиназ 2, принимающий участие в регуляции инвазии трофобласта в эндометрий матери и в регуляции ангиогенеза плаценты.

Как правило, для интерпретации клинической значимости обнаруженных в исследовании CNVs их сравнивают с каталогами вариаций числа копий участков ДНК, найденных у здоровых индивидов и зарегистрированных в Базе данных геномных вариантов (Database of Genomic Variants, DGV) и с вариациями, обнаруженными при каких-либо патологиях и описанных в базах данных DECIPHER (Databasy of genomic varIation and phenotype in humans using Ensembl resources), ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations), ISCA или OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

На сегодняшний день не существует единых критериев для оценки распространенности и патогенетической значимости CNVs в исследованиях невынашивания беременности. Rajcan-Separovic E. с коллегами в вышеупомянутых работах относили CNVs к категории распространенных, если они на 50 % процентов перекрывались с вариациями, обнаруженными у здоровых индивидов хотя бы в двух независимых исследованиях и были описаны в DGV (Rajcan-Separovic E. et al., 2010). Вариации, перекрывающиеся с таковыми у здоровых людей не более, чем на 50 %, а также вариации, не зарегистрированные в DGV, были классифицированы как уникальные. Robberecht C. с соавторами в своем исследовании считали уникальными все CNVs, которые не перекрывались с вариациями, описанными в DGV, на 100 % (Robberecht C. et al., 2012).

Однако, данные методы оценки значимости CNVs довольно условны и выводы относительно уникальности вариаций следует делать с осторожностью, поскольку не все CNVs, описанные в базах данных, верифицированы и часто выявлены при обследовании немногочисленных выборок. И даже при отсутствии обнаруженных CNVs в базах данных, аккумулирующих информацию о здоровых индивидах, нельзя утверждать, что именно эти вариации стали причинами развития патологии или гибели эмбриона.

Общепринято, что вариации числа копий большего размера, затрагивающие многие гены, с большей вероятностью связаны с патологиями, чем небольшие CNVs, не перекрывающиеся с кодирующими участками генома, а также, что делеции приводят к формированию более тяжелого патологического фенотипа, чем дупликации (Никитина Т. В. и др., 2013). Однако в геноме здоровых индивидов детектированы довольно крупные вариации числа копий участков ДНК, размеры которых варьируют в пределах от 5 до 5000 Кб, причем многие из них затрагивают кодирующие участки генома. Так, например, в работе Conrad D. F. с соавторами было обнаружено 92 полных и 109 частичных делеций генов у здоровых людей (Conrad D. F. et al., 2006). Кроме того, вариации, перекрывающиеся с некодирующими последовательностями ДНК, также потенциально могут быть связаны с изменениями функций генов и патологическими процессами, если они изменяют стабильность гена, сплайсинг или локализацию матричной РНК (Cartegni L. et al., 2002).

Первые работы, посвященные изучению соматической структурной вариабельности генома у внутриутробно погибших зародышей с помощью aCGH, были выполнены с использованием низкоразрешающих платформ BAC-чипов (BAC, Bacterial Artificial Chromosome – искусственная бактериальная хромосома) (Schaeffer A. J et al., 2004) или полногеномных матриц (Benkhalifa M. et al., 2005; Shimokawa O. et al,,2006; Menten B. et al., 2009; Robberecht C. et al., 2009). При этом было показано, что около 57 % абортусов, клетки которых не способны к пролиферации в культуре, обнаруживали хромосомные аномалии (Benkhalifa M. et al., 2005), что у 10-30 % абортусов наблюдались мозаичные формы анеуплоидии (Menten B. et al., 2009; Robberecht C. et al., 2009), а у 5 % спонтанных абортусов, для которых при стандартном кариотипировании был установлен нормальный кариотип, были обнаружены вариации числа копий участков ДНК (Shimokawa O. et al., 2006). Позже стали появляться работы с применением более высокоразрешающих модификаций aCGH на основе олигонуклеотидных последовательностей. Так, Zhang Y. X. с соавторами показали, что частота встречаемости CNVs у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом достигает 13 % (Zhang Y. X. et al., 2009).

Поскольку для интерпретации клинической значимости вариаций числа копий участков ДНК необходимо установить локализацию, генный состав и статус наследования CNVs, целесообразно проводить полногеномные исследования субмикроскопических хромосомных вариаций не только у спонтанных абортусов, но и у их родителей. На сегодняшний день известны единичные работы, выполненные с соблюдением этих условий, но объемы выборок исследованных зародышей в них невелики. В одной из таких

работ Rajcan-Separovic E. с коллегами провели полногеномный анализ CNVs 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 шесть уникальных вариаций числа копий участков ДНК размером не более 250 Кб. Две из них возникли *de novo* (dup13q32.1 и dup10p15.1), одна CNV была неизвестного происхождения (dup17p13.1), а оставшиеся три были унаследованы от кого-либо из родителей (del1q25.3, dupXq28, del7p14.3). Данные CNVs затрагивали ряд генов, обозначенных авторами в качестве кандидатных для нарушений внутриутробного развития: *GPR180, WDR37, WDR16, STX8, NSDH2, PTHB1*. Авторы полагают, что наибольший интерес вызывают случаи, в которых наблюдалось изменение числа копий генов, принадлежащих к одному семейству (syntaxin и WDR) у нескольких зародышей, что требует дальнейших исследований экспрессии этих генов в раннем эмбриогенезе человека и других млекопитающих.

В другой работе того же коллектива авторов было исследовано 26 зародышей, полученных от пар с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) (Rajcan-Separovic E. et al., 2010). У 13 абортусов, полученных от восьми пар с ПНБ было обнаружено 11 уникальных вариаций числа копий участков ДНК размером не более 500 Кб, при этом все они были унаследованы от кого-либо из родителей. Две дополнительные общие CNVs представляли особенный интерес, поскольку они затрагивали импринтированные гены (dupXp22.31 (*TIMP2*), del10q21.3 (*CTNNA3*)). Продукты генов *TIMP2* и *CTNNA3* являются ингибиторами инвазии трофобласта. В норме, *CTNNA3* экспрессируется в плаценте в первом триместре беременности с материнского гомолога. О связи гена *TIMP2* с привычным невынашиванием беременности у человека ранее не сообщалось, однако на модельных объектах было показано, что сверхэкспрессия данного гена выявлялась у мышей с ПНБ (Rajcan-Separovic E. et al., 2010). Таким образом, наследование вариаций, перекрывающихся с регионами, содержащими импринтированные гены, необходимые для нормального развития зародыша и функционирования плаценты (в случае CNV в сочетании с мутацией гена на втором гомологе), и генами с вариабельной экспрессивностью, может приводить к повторному нарушению в ходе следующей беременности и остановке эмбрионального развития. Кроме того, унаследованная CNV может негативно повлиять на течение беременности, если гены в области вариации участвуют в формировании ответа на воздействие стресс-фактора, и эмбрион подвергся этому воздействию.

В обсуждаемом исследовании также сообщается о поиске CNVs, затрагивающих гены *TIMP2* и *CTNNA3* с помощью количественной флуоресцентной ПЦР у 282 женщин с ПНБ и 61 фертильной женщины. Только у одной женщины из группы с ПНБ регистрировалась CNV, затрагивающая ген *CTNNA3*, в то время как не у одной из фертильных женщин таких вариаций обнаружено не было. Помимо *TIMP2* и *CTNNA3*, авторы выделяют еще два гена *EGFL6* (dupXp22.2) и *STS* (dupXp22.31). Известно, что данные гены активно экспрессируются в плаценте при нормальном протекании беременности, а кодируемые ими продукты влияют на восприимчивость матки и продукцию эстрогена (Rajcan-Separovic E. et al., 2010).

Позднее, в работе Wen J. с соавторами, посвященной изучению CNVs у спонтанных абортусов первого триместра беременности, путем анализа экспрессии 14 выявленных ранее и вовлеченных в CNVs 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 CNVs (Wen J. et al., 2015). Эти гены были вовлечены в dupXp22.2 (*TRAPPC2* и *OFD1*) или были разорваны дупликацией 17q25.3 (*TIMP2*). У внутриутробно погибших зародышей было показано возрастание уровня транскрипции РНК и трансляции для генов *TRAPPC2* и *OFD*, вовлеченных в микродупликацию или, наоборот, снижение данных показателей в присутствии микродупликации гена *TIMP2*. Уровень экспрессии гена *TIMP2* у абортусов не отличался от такового в контроле. Продукты данных генов участвуют в реализации процессов, важных для эмбриогенеза, так гены *TRAPPC2* и *TIMP2* связаны с поддержанием гомеостаза внеклеточного матрикса, а продукт гена *OFD* связан с функцией ресничек.

Warren J. E. с коллегами с помощью aCGH исследовали 30 абортусов с нормальным или неустановленным вследствие низкой пролиферативной активности клеток в культуре кариотипом, а также их родителей (Warren J. E. et al., 2009). Было обнаружено 4 вариации числа копий участков ДНК, возникших *de novo*. Две из них были локализованы в регионе Xp22.31. В обоих случаях эти CNVs были представлены дупликациями и не затрагивали гены, а их размеры составили 289 Кб. Интересно, что Rajcan-Separovic E. с коллегами обнаружили в этом же регионе унаследованную дупликацию размером 1593 Кб, перекрывающуюся с несколькими генами, в том числе с *STS*, описанным выше.

Среди унаследованных и не зарегистрированных в DGV вариаций числа копий участков ДНК в работе Warren J. E. с соавторами привлекают внимание CNVs, обнаруженные у нескольких погибших зародышей. Было показано, что четыре из шести абортусов обнаруживают CNVs в локусе 1p36.11, содержащем ген *RHD*, продукт которого

связан с транспортом натрия. CNV, детектированная в регионе 6p21.32, была ассоциирована с рассеянным склерозом и встречалась в тканях четырёх эмбрионов. Ещё у двух зародышей регистрировалась вариация в локусе 17q25.3. В данном регионе располагается последовательность гена, ортологичная гену *MafG* у мышей, связанного у них с тяжелыми аномалиями кроветворения и пренатальной летальностью (Warren J. E. et al., 2009).

В работе Robberecht C. с соавторами, выполненной на полногеномной SNP-платформе в восьми из одиннадцати исследованных случаев внутриутробной гибели зародышей были выявлены распространенные CNVs. У шести эмбрионов было обнаружено 11 уникальных вариаций числа копий участков ДНК, две из которых возникли *de novo*. Размеры CNVs находились в диапазоне от 3 до 1000 Кб (Robberecht C., 2012). Один эмбрион содержал не перекрывающуюся с генами dup11p11.12, возникшую *de novo* и локализованную в области сателлитных повторов между генами обонятельных рецепторов. Другой эмбрион содержал возникшую *de novo* вариацию, затрагивающую импринтированный ген *CDKN1C*, продукт которого является негативным регулятором пролиферации клеток. Кроме того, в трёх из шести случаев авторы обнаружили нейтральные потери гетерозиготности, что позволило им предположить о существовании связи между рецессивными мутациями и ПНБ (Robberecht C., 2012).

В работе Viaggi с коллегами, микроструктурная геномная вариабельность была изучена у 40 спонтанных абортусов I триместра беременности с нормальным кариотипом (Viaggi et al., 2013). Всего у 31 зародыша (77,5 %) было обнаружено сорок пять CNVs, семь из которых оказались уникальными, что особенно важно в поиске патогенетически значимых для эмбрионального развития вариаций. Авторы проанализировали генный состав CNVs и установили их вовлеченность в процессы регуляции транскрипции, клеточного транспорта, регуляции клеточного цикла, апоптоза, метилирования ДНК, модификации гистонов и клеточной дифференцировки. Однако отсутствие определения происхождения вариаций числа копий последовательностей ДНК затрудняет интерпретацию клинической значимости данных CNVs.

Интересные результаты были получены в работе Bagheri H. с соавторами, изучившими CNVs у 101 эуплоидного внутриутробно погибшего эмбриона (Bagheri H., 2015). Данным коллективом авторов было обнаружено 24 уникальных вариации, затрагивающих 93 гена и 372 распространенных CNVs, перекрывающихся с 354 генами. Уникальные и распространенные CNVs имели сопоставимые размеры в среднем 0,16 и 0,14 Мб, соответственно, однако уникальные CNVs продемонстрировали большую плотность генов в расчете на 1 Мб последовательности ДНК (56 генов/Мб и 24 гена/Мб,

соответственно; p = 0,03). Для генов, вовлеченных в уникальные CNVs, было показано обогащение неспецифических путей, в то время как среди генов, вовлеченных в распространенные CNVs, были обогащены гены, продукты которых участвуют в формировании иммунного ответа и в процессах, связанных с репродукцией и беременностью. Таким образом, авторы показали, что с развитием беременности потенциально могут быть ассоциированы не только уникальные, но и распространенные вариации числа копий участков ДНК (Bagheri H., 2015).

В недавно опубликованной работе с целью изучения вклада CNVs в этиологию ранних репродуктивных потерь было проведено полногеномное исследование 2186 внутриутробно погибших зародышей (Chen Y. et al., 2017). В работе было обнаружено 275 кандидатных генов, вовлеченных в вариации числа копий участков ДНК. Опираясь на базы данных, в которых собрана информация об эффектах различных мутаций, наблюдавшихся у модельных объектов (Mouse Genome Informatics и Zebrafish), авторы установили, что нарушения 75 % этих генов могут приводить к порокам развития. В данной группе были значительно обогащены гены, продукты которых участвуют в процессах эмбрионального развития, транскрипции генов и регуляции многих биологических процессов. В особенности, преобладали факторы транскрипции и известные гены развития, такие как *HOX*, гены гомеодомена *NKX*, а также *HAND2*, *NEUROG2* и *NEUROD1* (Chen Y. et al., 2017).

Недавний геномный анализ 44 пациентов с ПНБ (16 пар и 12 матерей) показал положительную корреляцию между количеством CNV и увеличением числа выкидышей (Karim S. et al., 2017). Общегеномное исследование структурных перестроек в группе детей, родившихся в малом гестационном возрасте (SGA, n = 51), выявило 18 редких CNV, из которых 8 были классифицированы как патогенные или, вероятно, патогенные (Canton A. P. et al., 2014). Все они возникли *de novo,* были богаты генами и имели значительный размер, включая гены, которые функционируют в процессе роста клеток, процессов развития и клеточного цикла. Параллельное исследование Wit et al., 2014 выявило 6 патогенных или потенциально патогенных CNV в 49 случаях, рожденных SGA.

Таким образом, исследования внутриутробно погибших эмбрионов, проведенные с целью изучения вариаций числа копий участков ДНК и их вклада в репродуктивные потери человека находятся на стадии накопления. Их продолжение обещает возможность картирования регионов генома и генов, дисбаланс по числу копий которых является критичным для нормального протекания беременности. К настоящему времени уже опубликовано около двух десятков работ, посвященных данной тематике, однако полученные данные заметно отличаются, как в плане исследованных групп (начиная от

спонтанных абортусов с нормальным, либо неустановленным кариотипом и заканчивая спонтанными абортусами от пар с ПНБ), объёмов изученных выборок (от 6 до 2186), использованных диагностических платформ (ДНК-микрочипы низкого разрешения на основе BAC-библиотек или ДНК-микрочипы высокого разрешения на основе олигонуклеотидных последовательностей), так и в отношении полученных результатов (частота выявленных CNVs варьирует в пределах от 0 до 55 %) (Никитина Т. В., 2013).

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Материал исследования

Настоящее исследование было проведено в соответствии с требованиями Комитета по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики СО РАМН.

Выборка состояла из 382 женщин, имеющих нормальный кариотип 46, XX, кариотипирование было проведено в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики ТНИМЦ РАН. Характер инактивации X-хромосомы был проанализирован в 198 образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови и 96 образцах ДНК, выделенной из эндометрия матки от 294 женщин с невынашиванием беременности (в некоторых случаях для одной и той же женщины были доступны как образцы периферической крови, так и эндометрия). Контрольная выборка состояла из 150 образцов ДНК из лейкоцитов периферической крови женщин без проблем с репродукцией, имеющих две и более нормально протекавшие беременности. К настоящему моменту анализ характера инактивации завершен для 111 из 150 женщин контрольной группы.

Средний возраст женщин с невынашиванием беременности составил 26,4 ± 4,4 года, а в контрольной группе - 28,5 ± 3,2 года.

2.2 Выделение ДНК из крови микрометодом

Стандартный микрометод выделения ДНК был модифицирован для работы в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики СО РАМН.

Кровь центрифугировали с 1XSSC 2 мин при 12000 об/мин, слили супернатант и повторили процедуру. К полученному клеточному осадку добавляли 10 % SDS и инкубировали при температуре 37 °C до полного растворения. Затем добавляли 150 мкл фенола и 150 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, не затрагивая нижнюю фазу и интерфазу. Проводили повторную экстракцию 300 мкл хлороформа. К водной фазе добавляли 96 % этиловый спирт. ДНК осаждали путем накручивания её саму на себя. Центрифугировали при 12000 об/мин 2 мин, далее сливали супернатант. Осадок промывали 200 мкл 70 % этилового спирта, сушили при 37 °C. После добавляли 50 мкл раствора TE (H2O, 10 mM Tris-HCl – pH 8.0, 1 mM EDTA) и оставляли при комнатной температуре. После выделения ДНК был проведен её количественный анализ на Spectrophotometer ND-1000.

2.3 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 B 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 B для фермента Hpa II, 1 мкл метилчувствительной эндонуклеазы Hpa II и 10 мкл минерального масла.

2.4 Амплификация локуса *AR* X-хромосомы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Ген рецептора андрогена *AR* локализован в регионе Xq12. В первом экзоне этого гена находится CAG-повтор, кодирующий полиглютаминовый участок. Метилирование HpaII и HpaI сайтов, расположенных 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. В связи с этим, ген *AR* является удобной модельной системой для оценки характера X-инактивации при использовании метил-чувствительной количественной ПЦР. Амплификацию 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*. Олигонуклеотидные праймеры для локусов AR были синтезированы фирмой Applied Biosystems. Обратный олигонуклеотид был мечен флуоресцентным красителем FAM:

  For 5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGC-3'

  Rev 5'- FAM-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCC-3'
- 10 мкМ каждого олигонуклетида в реакцию.

2.5 Анализ статуса инактивации с помощью капиллярного электрофореза

Электрофорез проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730xl. Разделение фрагментов ДНК идёт в тонком капилляре, заполненном электролитом, в зависимости от массы и заряда. Полученную информацию обрабатывали с помощью сопряженного программного обеспечения GeneMapper.

2.6 Матричная сравнительная геномная гибридизация

Для выявления вариаций числа копий участков ДНК использовался метод матричной сравнительной геномной гибридизации. aCGH – это высокоразрешающая технология, позволяющая проводить комплексное изучение всего генома в относительно короткие сроки (до пяти дней). Применение данного метода позволяет обнаруживать субмикроскопические хромосомные перестройки, не выявляемые при стандартном кариотипировании (Shinawi M., 2008), а также устанавливать кариотип в тех случаях, когда ткани спонтанных абортусов непригодны для культивирования. Однако aCGH имеет ряд ограничений, связанных с невозможностью детектировать нарушения плоидности и сбалансированные хромосомные перестройки (Merel M. J. Van den Berg, 2012). Кроме того, это относительно трудоёмкий и дорогостоящий метод.

aCGH была проведена с использованием ДНК-микрочипов высокого разрешения SurePrint G3 Human CGH+SNP Microarray Kit, 4×180K и SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4×180K (Agilent Technologies, USA) по протоколу, рекомендованному производителем и описанному ниже.

2.6.1 Подготовка геномной ДНК

На первом этапе работы с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, США) были определены концентрация и качество исследуемых образцов ДНК путем оценки соотношений A260/A280 и A260/A230. Оптимальная концентрация ДНК составила 100-300 нг/мкл. ДНК считалась свободной от белковых примесей и солей, если соотношение A260/A280 варьировало в диапазоне от 1,8 до 2,0, а A260/A230 было больше 1. Для гибридизации на микрочипе использовали образцы, удовлетворяющие всем перечисленным выше требованиям.

Далее, с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле окрашенном бромистым этидием (0,01 мкг/мкл) оценивался средний размер фрагментов ДНК для каждого образца. После проверки качества образцов были приготовлены водные растворы ДНК объемом 8 мкл (для микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray 4×180K (Agilent Technologies, США) с общим содержанием ДНК 500 нг.

2.6.2 Энзиматическое мечение образцов ДНК

Для удаления содержимого со стенок и крышки пробирки образцы центрифугировали при 6000 g в течение 1 минуты, а затем добавляли к ним по 5 мкл вырожденного праймера. Пробы инкубировали в твердотельном термостате при 98 °C в течение 10 минут, а затем ещё 5 минут на льду, после чего вновь центрифугировали при 6000 g в течение 1 минуты для удаления содержимого со стенок и крышки микропробирок.

Параллельно, на льду были приготовлены растворы флюоресцентных красителей цианина 3-dUTP (для контрольного образца ДНК) и цианина 5-dUTP (для исследуемых образцов). Из расчета на одну реакцию смешивали:

- 5 мкл 5× буфера,
- 2,5 мкл 10× раствора dNTP,
- 1,5 мкл цианин 3-dUTP или цианин 5-dUTP,
- 0,5 мкл фермента Exo (-) 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 °C в течение 2 ч и при 65 °C в течение 10 минут для инактивации фермента и переносили на лед.

2.6.3 Очистка меченых образцов ДНК

Для удаления конденсата со стенок и крышки микропробирок меченые образцы центрифугировали в течение 1 минуты при 6000 g. В 2 мл микропробирки помещали колонки для очистки ДНК, добавляя в них по 430 мкл буфера TE (pH 8,0) и переносили туда же меченую ДНК, аккуратно перемешивая пипетированием. Далее, при комнатной температуре центрифугировали образцы при 14000 g в течение 10 минут и, удалив фильтрат, помещали микроколонку в ту же пробирку, снова добавляя по 480 мкл буфера TE и повторяя этап центрифугирования при комнатной температуре (14000 g, 10 минут).

Далее, колонки переворачивали и переносили их в новые 2 мл пробирки, затем центрифугировали в течение 1 минуты при 10000 g и комнатной температуре для извлечения меченных и очищенных образцов.

Затем, образцы высушивали в концентраторе (Eppendorf, Германия) и растворяли в 9,5 мкл буфера TE, после чего проводили инкубацию на льду в течение 5 минут и перемешивали пипетированием 10 раз. В 1 мкл образца с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, США) определяли выход ДНК и специфическую активность, рассчитанную по формуле:

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

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

2.6.4 Подготовка меченной ДНК к гибридизации

Готовили рабочий раствор 10× блокирующего агента, добавив 1350 мкл стерильной воды в микропробирку, содержащую лиофилизированный 10×aCGH блокирующий агент. Инкубировали раствор при комнатной температуре 1 час, после чего перемешивали на центрифуге Vortex.

Гибридизационную смесь готовили, смешивая в расчете на 1 образец следующие реактивы:

- мкл C_0t-1 ДНК (1 мг/мл),
- 4,5 мкл 10×aCGH блокирующего агента,
- 22,5 мкл 10× HI-RPM гибридизационного буфера.

В 1,5 мл микропробирку, содержащую смесь контрольной и опытной меченной ДНК, добавляли 29 мкл гибридизационной смеси, перемешивали пипетированием и центрифугированием на Vortex для удаления конденсата. Инкубировали образцы при 98 °C 3 минуты и при 37 °C 30 минут. Затем, центрифугировали при 6000 g в течение 1 минуты. На этом этапе образцы считались подготовленными к гибридизации.

2.6.5 Гибридизация и отмывка

Слайд с отсеками для образцов помещали в камеру Agilent SureHyb и медленно переносили 40 мкл гибридизационной смеси в каждый из 4 отсеков слайда, при этом

остальные образцы до внесения их на слайд хранились при 37 °С. После внесения всех образцов, слайд с отсеками накрывали микрочиповым слайдом активной стороной вниз. Слайды прочно прижимали друг к другу и для распределения смеси по всему отсеку, а также, для оценки подвижности пузырька воздуха в нём вращали камеру. Затем, камеру со слайдами помещали в гибридизационную печь и инкубировали в течение 24 часов при 67 °С и 20 об./мин.

Буфер 2 для отмывки слайдов Oligo aCGH Wash Buffer 2 инкубировали ночь при 37 °С. В день отмывки в емкость №1 наливали буфер для отмывки 1 (Oligo aCGH Wash Buffer 1), который используется при комнатной температуре для отделения микрочипового слайда от слайда с отсеками. В емкость №2 помещали магнит и держатель для слайдов и также наливали буфер №1, в котором отмывали микрочиповый слайд при комнатной температуре с вращающимся магнитом в течение пяти минут. Затем слайд в держателе переносили в емкость №3, в которую во время отмывки в буфере №1 был помещен магнит и налит буфер №2, и отмывали при 37 °С одну минуту. Далее аккуратно извлекали слайд из буфера №2 так, чтобы на нем не осталось ни одной капли буфера и помещали в держатель для слайдов и сканировали в сканере для чтения флюоресцентных сигналов с микрочипов SureScan Microarray (Agilent Technologies, США). Обработку данных производили при помощи программ Feature Extraction и Cytogenomics v.3.0 (Agilent Technologies, США).

2.7 Классификация обнаруженных CNVs

Классификация вариаций числа копий участков ДНК (CNVs) осуществлялась с использованием баз данных DGV (Database of Genomic Variants) (http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home) и DECIPHER (Database of genomic varIation and phenotype in humans using Ensembl resources) (https://decipher.sanger.ac.uk/).

Анализ обогащения проведен с помощью инструмента Enrichr (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/), анализ функций генов проведен с помощью баз данных NCBI Gene (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) и NCBI PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

2.8 Анализ обогащения

Анализ обогащения по функциональной принадлежности (gene set enrichment analysis, GSEA) — совокупность методов для ассоциации набора генов с изменением

фенотипа. Для формализации существующих данных о фенотипе такие методы часто используют базы данных предварительно аннотированных наборов генов (например, термины проекта Gene ontology (GO): молекулярные функции, биологические процессы или клеточные компоненты). Результатом применения метода (выдачей программы) в этом случае является множество преаннотированных наборов, частота встречаемости которых во входном наборе статистически значимо отличается от фоновой (например, частоты во всём геноме или в другом наборе генов). Такие преаннотированные наборы называют перепредставленными (если частота выше фоновой) или недопредставленными (если частота ниже фоновой).

Важным нововведением GSEA по сравнению с более ранними методами анализа является возможность анализировать данные не только по отдельным генам независимо, но и учитывать функциональные связи генов между собой. В некоторых случаях, например при слабом изменении индивидуальной экспрессии отдельных генов, применение GSEA приводит к повышению чувствительности метода и получению более полной картины дифференциальной экспрессии.

Анализ обогащения выполнен с помощью инструмента Enrichr (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дементьева Е. В. Дозовая компенсация: регуляция экспрессии генов половых хромосом / Е. В. Дементьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, №4-2. – С. 902-913.
2. Лебедев И. Н. Цитогенетика нарушений эмбрионального развития человека / И. Н. Лебедев, Т. В. Никитина // Серия Наследственность и здоровье. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура». – 2013. – С. 120
3. Никитина Т. В. Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности / Т. В. Никитина [и др.] // Медицинская генетика – 2013. – № 1. – С. 26-35.
4. Радзинский В. Е. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС / В. Е. Радзинский // М.: Редакция журнала StatusPraesens. – 2015. – С. 48
5. Толмачева Е. Н. Аномалии инактивации Х-хромосомы и патология человека: генетические и эпигенетические аспекты, подходы к ДНК-диагностике / Е. Н. Толмачева, А. Е. Подлевская, И. Н. Лебедев // Новосиб. Академиздат, Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. – 2017. – С. 16-27.
6. Толмачева Е. Н. Асимметричная инактивация Х-хромосомы у эмбрионов человека с мозаичной трисомией хромосомы 16 / Е. Н. Толмачева [и др.] // Генетика. – 2011. – Т. 47, №3. – С. 401-405.
7. Толмачева Е. Н. Инактивация Х-хромосомы и патология человека / Е. Н. Толмачева, А. А. Кашеварова, И. Н. Лебедев // Медицинская генетика. – 2009. – Т. 8. № 7. – С. 9-15.
8. Усманова Н. М. Вариации числа копий отдельных сегментов – новая форма изменчивости генома / Н. М. Усманова // Цитология. – 2007. – Т. 51, № 7. – С. 549-550.
9. Belmont J. W. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing / J. W. Belmont // Am. J. Hum. Genet. – 1996. – Vol. 58. – P. 1101-1108.
10. Benkhalifa M. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro / M. Benkhalifa [et al.] // Prenat. Diagn. – 2005. – Vol. 25. – P. 94-900.
11. Bolduc V. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans / V. Bolduc [et al] // J Clin Invest. – 2008. – Vol.118. – P. 333-341.

12. Brown C. J. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome / C. J. Brown [et al] // Nature. – 1991. – Vol. 349. – P. 38-44.
13. Brown C. J. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation / C. J. Brown, J. M. Greally // Trends Genet. – 2003. – Vol. 19. – P. 432-438.
14. Canton A. P. Genome-wide screening of copy number variants in children born small for gestational age reveals several candidate genes involved in growth pathways / A. P. Canton [et al.] // Eur J Endocrinol. – 2014. – Vol. 171(2). – P. 253–262.
15. Carrel L. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females / L. Carrel, H. E. Willard // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P. 400-404.
16. Cartegni L. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing / L. Cartegni [et al.] // Nat. Rev. Genet. – 2002. – Vol. 3. – P. 285-298.
17. Chadwick B. P. Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome / B. P. Chadwick, H. F. Willard // Hum. Mol. Genet. – 2003. – Vol. 12. – P. 2167-2178.
18. Chen Gao Y. Characterization of chromosomal abnormalities in pregnancy losses reveals critical genes and loci for human early development / Y. Chen Gao [et al.] // Human Mutation. – 2017. –Vol. 38. – P. 669-677.
19. Chen W. K. Mapping DNA structural variation in dogs / W. K. Chen [et al.] // Genome Res. – 2009. – Vol. 19. – P. 500-509.
20. Chiurazzi P. XLMR genes: update 2000 / P. Chiurazzi, B. C. J. Hamel, G. Neri // J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 9. – P. 71-81.
21. Conrad D. F. Articles Legal documents include patents include citations Advanced search Create alert My Citations Settings A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome / D. F. Conrad [et al.] // Nat. Genet. – 2006. – Vol. 38, № 1. – P. 75-81.
22. Csankovszki G. Synergism of *XIST* RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation / G. Csankovszki, A. Nagy, R. Jaenisch // Cell Biol. – 2001. – Vol. 153. – P. 773-784.
23. Disteche C. M. Escape from X inactivation in human and mouse / C. M. Disteche // Trends Genet. – 1995. – Vol. 11(1). – P. 17-22.
24. Fadista J. A snapshot of CNVs in the pig genome / J. Fadista [et al.] // Plos One. – 2008. – Vol. 3. – P. 1-9.
25. Freeman S. B. Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down syndrome / S. B. Freeman, Q. Yang, K. Allran, L. F. Taft, S. L. Sherman // Am J Hum Genet. – 2000. – Vol. 66. – P. 1680–1683.

26. Graubert T. A. A high-resolution map of segmental DNA copy number variation in the mouse genome / T. A. Graubert [et al.] // PLoS Genet. – 2007. – Vol. 3. – P. 21-29.
27. Griffin D. K. The incidence, origin and etiology of aneuploidy / D. K. Griffin // Int. Rev. Cytol. – 1996. – Vol. 167. – P. 263-295.
28. Guryev V. Distribution and functional impact of DNA copy number variation in the rat / V. Guryev [et al.] // Nat. Genet. – 2008. – Vol. 40. – P. 538-545.
29. Heard E. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome / E. Heard, C. M. Disteche // Genes & Development. – 2006. – Vol. 20. – P. 1848-1867.
30. Heard E. X chromosome inactivation in mammals / E. Heard, P. Clerc, P. Avner // Annu.Rev.Genet. – 1997. – Vol. 31. – P. 571-610.
31. Henrichsen C. N. Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes / C. N. Henrichsen [et al.] // Nature Genetics. – 2009. – Vol. 41 (4). – P. 424-429.
32. Huynh K. D. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos / K. D. Huynh, J. T. Lee // Nature. – 2003. – Vol. 426. – P. 857-862.
33. Iafrate A. J. Detection of large-scale variation in the human genome / A. J. Iafrate [et al.] // Nature Genetics. – 2004. – Vol. 36 (9). – P. 949-951.
34. Karim S. Genomic answers for recurrent spontaneous abortion in Saudi Arabia: An array comparative genomic hybridization approach / S. Karim [et al.] // Reprod Biol. – 2017. – Vol. 17(2). – P. 133–143.
35. Kline J. Trisomic pregnancy and earlier age at menopause / J. Kline, A. Kinney, B. Levin, D. Warburton // Am J Hum Genet. – 2000. Vol. 67. – P. 395–404.
36. Levin J. H. Non-random maternal X-chromosome inactivation associated with phaces / J. H. Levin, S. G. Kaler // Clin. Genet. – 2007. – Vol. 72(4). – P. 345-350.
37. Lyon M. F. Gene action in the X chromosome of the mouse (Mus musculus) / M. F. Lyon // Nature. – 1961. – Vol. 190. – P. 372-373.
38. Lyon M. F. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation / M. F. Lyon // Annual Review of Genetics. – 1992. – Vol. 26. – P. 16-28.
39. Macklon N. S. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss / N. S. Macklon, J. P Geraedts, B. C. Fauser // Hum. Reprod. Update. – 2002. – Vol. 8, №4. – P. 333–343.
40. Menten B. Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples / B. Menten [et al.] // BMC Medical Genetics. – 2009. – Vol. 10. – P. 89-94.

41. Migeon B. R. Females are mosaics. X inactivation and Sex Differences in Disease / B. R. Migeon // Nature Genetics. – 2007. – Vol. 39 (9). – P. 1043
42. Minks J. A skewed view of X chromosome inactivation / J. Minks [et al] // J. Clin. Invest. – 2008. – Vol. 118. – P. 20-23.
43. Nguyen D. Q. Bias of Selection on Human Copy-Number Variants / D. Q. Nguyen, C. Webber, C. P. Pontingn // PLoS Genet. – 2006. – Vol. 2. – P. 198-207.
44. Okamoto I. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development / I. Okamoto [et al] // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 644-649.
45. Orstavik K. H. Skewed X inactivation in healthy individuals and in different disease / K. H. Orstavik // Acta Pediatrica. – 2006. – Vol. 451. – P. 24-29.
46. Perry G. H. Hotspots for copy number variation in chimpanzees and humans / G. H. Perry [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 8006-8011.
47. Pirrotta V. Assembly of polycomb complexes and silencing mechanisms / V. Pirrotta [et al] // Genetica. – 2003. – Vol. 117. – P. 191-197.
48. Plenge R. M. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation / R. M. Plenge [et al.] // Nat Genet. – 1997. - Vol. 17(3). – P. 353-356.
49. Plenge R. M. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders / R. M. Plenge [et al] // Am. J. Hum. Genet. – 2002. – Vol. 7. – P. 168-173.
50. Rajcan-Separovic E. Identification of copy number variants in miscarriage from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss / E. Rajcan-Separovic [et al.] // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 25. – P. 2913-2922.
51. Redon R. Global variation in copy number in the human genome / R. Redon [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 444 (7118). – P. 444-454.
52. Robberecht C. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hysteroembryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss / C. Robberecht [et al.] // Pre nat. Diagn. – 2012. – Vol. 4. – P. 1-10.
53. Robberecht C. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls / C. Robberecht [et al.] // Genet. Med. – 2009. – Vol. 11. – P. 646-654.
54. Ross M. T. The DNA sequence of the human X chromosome / M. T. Ross [et al] // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P. 325-337.
55. Sado T. Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *TSIX* / T. Sado [et al] // Development. – 2001. – Vol. 128. – P. 1275-1286.

56. Schaeffer A. J. Comparative Genomic Hybridization–Array Analysis Enhances the Detection of Aneuploidies and Submicroscopic Imbalances in Spontaneous Miscarriages / A. J. Schaeffer [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2004. – Vol. 74. – P. 1168-1174.
57. Shimokawa O. Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with «normal» karyotypes / O. Shimokawa [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2006. – Vol. 140. – P. 1931-1935.
58. Sui Y. Association of skewed X chromosome inactivation and idiopathic recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis / Y. Sui, Q. Chen, X. Sun // Reprod. Biomed. Online – 2015. – Vol. 31(2). – P. 140-148.
59. Vallot C. Erosion of X Chromosome Inactivation in Human Pluripotent Cells Initiates with XACT Coating and Depends on a Specific Heterochromatin Landscape / C. Vallot [et al] // Cell Stem Cell. – 2017. – Vol. 16(5). – P. 533-546.
60. Vallot C. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells / C. Vallot [et al] // Nat. Genet. – 2013. – Vol. 45(3). – P. 239-241.
61. Van den Berg I. M. X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos / I. M. Van den Berg // J. Hum. Genet. – 2009. – Vol. 84(6). – P. 771-779.
62. Van den Veyver I. B. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases / I. B. Van den Veyver [et al.] // Prenat. Diagn. – 2009. – Vol. 29 (1). – P. 29-39.
63. Viaggi C. D. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH / C. D. Viaggi [et al.] // J Appl Genet. – 2013. – Vol. 54, № 3. – P. 353-359.
64. Warren J. E. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation / J. E. Warren [et al.] // Obstet. Gynecol. – 2009. – Vol. 114. – P. 1093–1102.
65. Wen J. Functional consequences of copy number variants in miscarriage / J. Wen [et al.] // Molecular Cytogenetics. – 2015. – Vol. 8. – P. 6-15.
66. Wit J. M. Copy number variants in short children born small for gestational age / J. Wit [et al.] // Horm Res Paediatr. – 2014. – Vol. 82(5). – P. 310–318.
67. Wutz A. X inactivation Xplained / A. Wutz, J. Gribnau // Curr Opin. Genet. Dev. – 2007. – Vol. 17. – P. 387-393.
68. Zarrei M. A copy number variation map of the human genome / M. Zarrei [et al.] // Nat. Rev Genet. – 2015. – Vol. 16 (3). – P. 172-183.
69. Zhang Y. X. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and arrayCGH / Y. X. Zhang [et al.] // Clin Genet. – 2009. – Vol. 75. – P. 133-140.

АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Отчет о проверке на заимствования №1

Автор: Бабай Таня watwat6490@gmail.com / ID: 5320301
Проверяющий: Бабай Таня (watwat6490@gmail.com / ID: 5320301)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- http://users.antiplagiat.ru

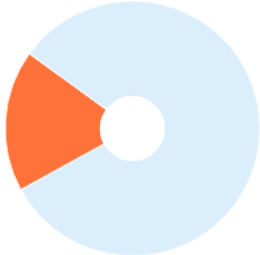
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 17
Начало загрузки: 16.06.2019 16:03:58
Длительность загрузки: 00:00:01
Имя исходного файла: вкр Бабай1
Размер текста: 81 кБ
Символов в тексте: 80663
Слов в тексте: 10481
Число предложений: 1038

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 16.06.2019 16:04:00
Длительность проверки: 00:00:05
Комментарии: не указано
Модули поиска: Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
18,1%	0%	81,9%



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	2,81%	3,14%	https://esu.citis.ru/ikrbs/5HDI...	https://esu.citis.ru	21 Мар 2018	Модуль поиска Интернет	30	38
[02]	2,38%	2,38%	С.А.Лавров, М.В.Кибанов.Не...	http://inbi.ras.ru	раньше 2011	Модуль поиска Интернет	17	17
[03]	2,16%	2,3%	Статья	http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru	03 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет	17	19

Еще источников: 17
Еще заимствований: 10,76%

Директору Биологического института,

д-ру биол. наук Д. С. Воробьёву

от н. с. НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ,

канд. биол. наук Е. Н. Толмачёвой

Служебная записка

Выпускная квалификационная работа «Анализ CNVs у женщин с экстремальным смещением инактивации Х-хромосомы и невынашиванием беременности» студентки 4 курса БИ кафедры цитологии и генетики Бабай Т. С., выполненная на базе НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН в лаборатории цитогенетики, содержит в себе сведения, представляющие интеллектуальную собственность НИИ медицинской генетики ТНИМЦ РАН, в связи с чем текст ВКР не может быть опубликован в репозитории целиком. Прошу разрешить размещение текста ВКР в репозитории с изъятием раздела «Результаты и обсуждение».

«14» 06 2019г. _____

подпись

Директор института ДИРЕКТОР БИ Воробьев Д.С. _____

подпись