

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.05.54-62>

Цитогеномный подход в диагностике инвертированных дупликаций со смежными терминальными делециями

Юрченко Д.А.¹, Миньженкова М.Е.¹, Твеленева А.А.², Воронцова Е.О.^{1,3}, Харченко Т.В.⁴, Шилова Н.В.¹

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 – ПАО «Центр Генетики и Репродуктивной Медицины «ГЕНЕТИКО»
119333, г. Москва ул. Губкина, д. 3, корп. 1

3 – ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

4 – ФГБОУ ВО Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации
191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41

В статье обсуждается роль молекулярно-цитогенетических методов в контексте цитогеномной диагностики хромосомных аномалий. На сегодняшний день основным методом детекции вариаций числа копий участков ДНК (Copy Number Variation – CNV) в клинической практике является хромосомный микроматричный анализ (ХМА). Однако, метод имеет существенное ограничение из-за отсутствия информации о числе и структуре хромосом, вовлеченных в перестройку, а также невозможности установить механизм, приводящий к определенному хромосомному дисбалансу. Поэтому возникает необходимость использования дополнительного метода (или методов) для верификации результатов ХМА, одним из которых является флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Использование комплексного (цитогеномного) подхода в диагностике хромосомных перестроек позволяет не только детектировать CNV, но и определить структуру и предположить механизм формирования хромосомного дисбаланса. В своей работе мы показали возможность и важность использования дополнительных лабораторных генетических методов на примере диагностики и изучения инвертированных дупликаций со смежными терминальными делециями (inv dup del). Разработанные несерийные (homemade) ДНК-зонды позволили детализировать структуру и подтвердить гипотезу об инвертированной ориентации дублированного сегмента на примере двух хромосомных перестроек — inv dup del(7q) и inv dup del(8p). Продемонстрированный цитогеномный подход, позволяющий интерпретировать сложные хромосомные перестройки, такие как inv dup del, подчеркивает важность и необходимость персонализации каждого случая диагностики хромосомных аномалий.

Ключевые слова: цитогеномная диагностика, несерийные ДНК-зонды, коммерческие ДНК-зонды, FISH, хромосомный дисбаланс, inv dup del, CNV

Для цитирования: Юрченко Д.А., Миньженкова М.Е., Твеленева А.А., Воронцова Е.О., Харченко Т.В., Шилова Н.В. Цитогеномный подход в диагностике инвертированных дупликаций со смежными терминальными делециями. *Медицинская генетика* 2023; 22(5): 54-62.

Автор для корреспонденции: Дарья Александровна Юрченко; e-mail: dashalbv@mail.ru

Финансирование. Исследование проведено в рамках темы государственного задания № 122032300370-1 «Изучение структурно-функциональных особенностей и механизмов формирования хромосомных аномалий и геномного дисбаланса».

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 04.05.2023

Cytogenomic approach in the diagnostics of inverted duplication/deletion rearrangements

Yurchenko D.A.¹, Minzhenkova M.E.¹, Tveleneva A.A.², Vorontsova E.O.^{1,3}, Kharchenko T.V.⁴, Shilova N.V.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Center of genetics and reproductive medicine GENETICO
3-1, Gubkina st., Moscow, 119333, Russian Federation

3 – Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Ministry of Health of Russia
1, Ostrovitianov st., Moscow, 117997, Russian Federation

4 – North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
41, Kirochnaya st., Saint-Petersburg, 191015, Russian Federation

The article describes the role of molecular cytogenetic methods in the context of cytogenomic approach of chromosomal abnormalities. Only the use of a complex (cytogenomic) approach in the diagnosis of chromosomal rearrangements makes it possible to detect CNV,

as well as to determine the structure and mechanism of the formation of chromosomal imbalance. In our work, we have shown the possibility and importance of using additional research methods on the example of diagnosing and studying inverted duplications with adjacent terminal deletions (inv dup del). The developed homemade DNA-probes made it possible to detail the structure and confirm the hypothesis of the inverted orientation of the duplicated segment using two chromosome rearrangements, inv dup del(7q) and inv dup del(8p), as an example. The demonstrated cytogenomic approach, which allows the interpretation of complex chromosomal rearrangements such as inv dup del, highlights the importance and necessity of personalizing each case of chromosomal abnormality diagnosis.

Keywords: cytogenomic approach, homemade DNA-probe, commercial DNA-probe, FISH, chromosomal imbalance, inv dup del, CNV

For citation: Yurchenko D.A., Minzhenkova M.E., Tveleneva A.A., Vorontsova E.O., Kharchenko T.V., Shilova N.V. Cytogenomic approach in the diagnostics of inverted duplication/deletion rearrangements. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(5): 54-62. (In Russ.)

Corresponding author: Darya A. Yurchenko, **e-mail:** dashalbv@mail.ru

Funding: The work was supported by the state task № 122032300370-1 "Study of structure-functional features and mechanisms of formation of the chromosomal abnormalities and genomic imbalance".

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 04.05.2023

Введение

Стремительное развитие медицинской генетики в целом и методов цитогенетики в частности, привело к прорыву в диагностике хромосомных болезней. Арсенал доступных генетических методов в последнее время значительно пополнился, что привело к смене парадигмы от цитогенетики к цитогеномике и формированию нового взгляда на изучение и диагностику хромосомных аномалий, таких как вариации числа копий участков ДНК (CNV) [1,2]. Цитогеномика (или цитогеномная диагностика) используется в качестве обобщающего термина, методологический арсенал которого охватывает не только стандартное цитогенетическое исследование, но и включает молекулярно-цитогенетические методы (флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), микрочиповые технологии), а также методы на основе молекулярной генетики [3].

На сегодняшний день в качестве метода «первой линии» для детекции микроскопических и субмикроскопических CNV (делеций и/или дупликаций) все чаще используется хромосомный микроматричный анализ (ХМА) [4, 5]. Несмотря на множество достоинств этого метода (скорость исследования, полногеномный охват, возможность детекции субмикроскопических CNV), важно отметить, что имеется и ряд существенных ограничений. Основным ограничением ХМА является невозможность получения сведений о топографии и структуре хромосомного дисбаланса, что сопряжено с неправильной интерпретацией полученных результатов, и, как следствие, осложняет формирование гипотезы о механизме возникновения CNV. Таким образом, совершенно обоснованным является исполь-

зование дополнительных методов для верификации полученных при ХМА результатов [1–3].

Наиболее предпочтительным методом визуализации структуры хромосомного дисбаланса является FISH с коммерческими ДНК-зондами. Однако традиционные FISH-технологии наиболее подходят для ситуаций, когда исследуемый фрагмент ДНК имеет значительные размеры и локализован в известном хромосомном регионе. При необходимости верификации CNV меньшего размера требуется использование методов с более высокой чувствительностью и специфичностью. Кроме того, потенциальная возможность повсеместной геномной локализации CNV, выявляемых при использовании технологий полногеномного анализа, существенно ограничивает применение для данной технологии коммерческих ДНК-зондов [6]. Поэтому разработка усовершенствованных ДНК-зондов для диагностики CNV позволяет не только точно верифицировать количество геномных копий отдельных участков ДНК, но и детализировать структуру и происхождение геномного дисбаланса.

Так, например, CNV в виде дупликации со смежной делецией, детектированные с использованием ХМА, сложно интерпретировать без дополнительных методов исследования [7]. Отсутствие информации об ориентации дуплицированного сегмента значительно осложняет понимание формирования такой сложной сочетанной хромосомной перестройки. Установление инвертированной ориентации дуплицированного региона, позволяет не только уточнить структуру хромосомной перестройки как инвертированная дупликация со смежной терминальной делецией (inv dup del),

установить корреляцию генотипа и фенотипа, но и обеспечить корректное медико-генетическое консультирование семьи, в которой имеется больной ребенок.

В настоящей работе, с целью визуализации структурных хромосомных перестроек, верификация которых ограничена наличием коммерческих ДНК-зондов, был разработан альтернативный подход к анализу полученных при проведении ХМА данных, основанный на методе FISH с локус-специфичными несерийными (homemade) ДНК-зондами. Такой подход был использован для верификации и установления природы двух дупликаций, выявленных методом ХМА.

Методы

Объектом для исследования послужили образцы периферической крови пациентов ($n=2$) с аномальным фенотипом и генотипом, представленным сочетанным вариантом патогенных CNV, а именно интерстициальными дупликациями со смежными терминальными делециями — $\text{dup del}(7q)$ и $\text{dup del}(8p)$.

Все пациенты направлены на исследование врачами научно-консультативного отдела и консультативного отделения ФГБНУ «МГНЦ». Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 4/2 от 19 апреля 2021 г.). Получено добровольное информированное согласие на участие пациентов в научном исследовании.

Методом исследования первой линии в изучаемых случаях был хромосомный микроматричный анализ, который был выполнен в МГЦ «Геномед» с использованием олигонуклеотидных микроматриц CytoScan HD (Affymetrix, США). Результаты молекулярного кариотипирования записаны согласно номенклатуре I SCN 2020 [8].

Для верификации хромосомного дисбаланса использовали FISH с коммерческими ДНК-зондами, которую проводили на хромосомных препаратах из культивированных лимфоцитов периферической крови. Для детекции терминальной делеции была проведена FISH с субтеломерными ДНК-зондами на короткое и длинное плечи хромосом 7 и 8 по протоколу фирмы-производителя (Kreatech, Нидерланды; MetaSystems, Германия). Многоцветную FISH проводили с набором mBAND (XCyte) для хромосом 7 и 8, по протоколу фирмы-производителя (MetaSystems, Германия).

В качестве альтернативного подхода к верификации хромосомного дисбаланса была проведена FISH с разработанными в лаборатории цитогенетики ФГБНУ

«МГНЦ» несерийными (homemade) ДНК-зондами. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST NCBI [9] и базы данных UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). Проверка специфичности выбранных праймеров проводилась с использованием программы OligoAnalyzer™ Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Последовательности подобранных ДНК-праймеров (таблица) были использованы для проведения LR-ПЦР с использованием набора BioMaster LR HS-PCR (2x) (ООО «БиолабМикс», Россия) на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя (<http://www.biolabmix.ru>).

Результаты амплификации детектировали методом горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле, окрашенном этидием бромидом (0,01 мкг/мкл). Полученные ампликоны очищали на колонках с использованием набора diaGene для очистки ДНК из реакционных смесей (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя с последующим объединением в одну пробирку очищенных продуктов ПЦР для получения ДНК-зонда размером 30 т.п.н. С целью введения флуоресцентной метки в ДНК-зонд использовали метод Nick-трансляции. 1 мкг продуктов ПЦР метили, используя 5 мкл смеси dNTP (0,3 мМ dATP, dGTP, dCTP, 0,06 мМ dTTP) (Thermo Scientific, США), 2,5 мкл 0,2 мМ dUTP, меченного соответствующим Green 496 dUTP или Red 580 dUTP (Enzo Life Sciences, Inc., США), 1 мкл 5 мг/мл BSA (New England Biolabs, США), 2,5 мкл 0,02 U/мкл ДНКазы I, 1 мкл 10 U/мкл ДНК-полимеразы I (Thermo Scientific, Литва). Общий объем смеси доводили до 50 мкл. Полученный микс инкубировали 120 мин при 15°C, 10 минут при 70°C. Для остановки реакции добавляли 15 мкл Cot-1 (BIORON, Германия). Осаждение ДНК проводили в растворе, содержащем 1/10 объема 3М ацетата натрия (6,5 мкл) и 2,5 объема 96% ледяного этанола (162,5 мкл) в течение ночи при -20°C с последующим центрифугированием при 15000 об/мин и +4°C в течение 60 мин (Hettich zentrifugen universal 320 R, Германия). Надосадочную жидкость удаляли и высушивали осадок 10-20 минут при 45°C. Готовые ДНК-зонды растворяли в буфере (10 мкл 50 % формамид /10% декстран сульфат / 2 × SSC, pH 7.0). Для проведения FISH с несерийными ДНК-зондами использовали отдельную денатурацию ДНК на хромосомном препарате и ДНК-зонда. Предварительно был выполнен шаг прегибридизации хромосомного препарата на

предметном стекле в растворе 2×SSC при 37°C 45 минут. Затем, предметное стекло денатурировали 3 мин при 73°C в растворе 70 % формамид / 2×SSC с последующей дегидратацией в серии ледяных спиртов (70%, 85%, 96%), после чего предметное стекло с хромосомными препаратами высушивали при комнатной температуре. Отдельно денатурировали ДНК-зонды при 75°C 5 минут и доводили до температуры 37°C, после чего наносили на предметные стекла с денатурированной ДНК хромосом. Гибридизацию проводили при 37°C в тёмной влажной камере в течение 16-20 часов. Постгибридизационную отмывку проводили в растворе 4×SSC / 0.1 Triton при 45°C по 5 минут трижды. Для контрокрашивания хромосом использовали DAPI I (Abbott Molecular, США) в растворе Vectashield (Vector Labs, США) в соотношении 1:20.

Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе AxioImager M.1 (Carl Zeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений Isis (MetaSystems, Германия).

Результаты

В качестве метода исследования первой линии в обоих случаях был проведен ХМА. Молекулярный кариотип в случае 1: $arr[hg19]7q33q36.1(136815643_151166947) \times 3, 7q36.1q36.3(151167135_159119707) \times 1$, что свидетельствует о дупликации на длинном плече хромосомы 7, затрагивающей регионы 7q33q36.1, размером 14,35 млн п.н. и смежной с ней терминальной делецией 7q36.1q36.3 размером 8 млн п.н. Молекулярный кариотип в случае 2: $arr[hg19]8p23.3p23.1(158048_6982257) \times 1, 8p23.1p12(12528482_33760127) \times 3$, что соответствует наличию дупликации на коротком плече хромосомы 8, затрагивающей регионы 8p23.1p12, размером 21,2 млн п.н. и смежной с ней терминальной делецией 8p23.3p23.1 размером 6,8 млн п.н.

Метафазный FISH-анализ с ДНК-зондами на субтеломерные районы плеч хромосом 7 и 8 и многоцветный бэндинг этих хромосом подтвердили как терминальные делеции 7q и 8p (рис. 1 А, Б), так и инвертированную ориентацию дуплицированных сегментов (рис. 1 В, Г).

Дороговизна и практическая недоступность в настоящее время многоцветных технологий FISH явились поводом для разработки альтернативного хромосомному бэндингу метода для верификации полученных результатов ХМА. С целью определения

ориентации дуплицированного фрагмента в случае 1, на область 7q34q35 были синтезированы два несерийных (homemade) ДНК-зонда на основе олигонуклеотидов, полученных методом ПЦР длинных фрагментов и меченных в реакции nick-трансляции соответствующим флуорохромом (Texas Red/Spectrum Green). Размер каждого ДНК-зонда составлял 30 т.п.н. Схема расположения ДНК-зондов и полученный результат гибридизации показаны на рис. 2А, нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице. На область дупликации 8p22 для случая 2 были также разработаны два несерийных (homemade) ДНК-зонда, размером около 30 т.п.н., локализованных на расстоянии 3,65 млн п.н. друг от друга. Схема расположения ДНК-зондов и полученный результат гибридизации показаны на рисунке 2Б, последовательности праймеров представлены в таблице.

Используя локус-специфичные ДНК-зонды, полученные методом ПЦР длинных фрагментов, удалось подтвердить, что дупликация имела инвертированную ориентацию в обоих случаях. Поскольку в случае 2 удалось визуализировать несерийные ДНК-зонды, расстояние между которыми составляло 3,65 млн п.н., можно считать этот размер хромосомного дисбаланса (дупликация) минимальным для установления копияности и ориентации CNV.

Таким образом, было показано как на примере *inv dup del(7q)*, так и *inv dup del(8p)*, что разработанный альтернативный подход к определению структуры хромосомного дисбаланса при *inv dup del*, может быть применен и в дальнейших исследованиях, заменив коммерческий набор для многоцветного бэндинга соответствующих хромосом, предлагаемого производителем «MetaSystems» (Германия).

Обсуждение

Цитогеномный подход, подразумевающий комбинацию цитогенетических и молекулярно-(цито)генетических методов, позволяет не только точно определять количество геномных копий отдельных участков ДНК, но и детализировать структуру, происхождение, а также механизм формирования геномного/хромосомного дисбаланса [1–3,10]. Широкое применение в клинической практике цитогеномного анализа в изучении и диагностике сочетанных CNV привели к открытию сложных комплексных хромосомных перестроек. Так, например, описываемые авторами изолированные терминальные дупликации или изолированные терминальные делеции на самом деле были

инвертированными дупликациями со смежными терминальными делециями [11, 12]. Все это обусловлено сложной конституцией хромосомного дисбаланса и невозможностью определения детальной структуры при использовании только стандартного цитогенетического исследования.

Инвертированная дупликация со смежной терминальной делецией является редкой комплексной конституциональной структурной хромосомной аномалией. На сегодняшний день данные о механизмах образования геномного дисбаланса при хромосомных перестройках *inv dup del* широко дискутируются в литературе [10,13,14]. Считается, что в основе лежит формирование симметричной дицентрической хромосо-

мы, а так как дицентрическая хромосома является нестабильной структурой, то во время анафазы мейоза I происходит асимметричный разрыв, который приводит к образованию двух реципрокных продуктов в виде хромосом с дисбалансом: одной – с инвертированной интерстициальной дупликацией на одном плече хромосомы и потерей смежного с ней терминального района, другой – с терминальной делецией на этом же плече хромосомы [10,13–16]. Важно отметить, что прорывом в изучении и диагностике хромосомной аномалии *inv dup del* стало именно внедрение молекулярно-цитогенетических методов, таких как FISH и ХМА. Но изолированное использование ХМА позволяет установить только факт наличия двух CNV – терминальной де-

Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

Primer nucleotide sequences

Название праймеров	Последовательность праймеров, 5'-3'	Длина ПЦР продукта, п.н.	Геномные координаты (GRCh37/hg19)
7q33-1	F: ACGGAGGTGGTAATGTTCCGACACGAA	9001	chr7:138,411,424–138,439,955
	R: AGATGCCAAAGCCCATGTGAGGGTAGAG		
7q33-2	F: CTCTACCCTCACATGGGCTTTGGCATCT	9706	
	R: TATCCTGTAGAACGCTTCCCTCTGGGGT		
7q33-3	F: ACCCCAGAGGGAAGCGTTCTACAGGATA	9881	
	R: GTCACCATCCAGGGTCACTCAACACACT		
7q35-1	F: GTGAAGTGAATCTACACCGGACAGGCCA	9732	
	R: AGATGATTGTGAGGTTGGGCTGGATGCT		
7q35-2	F: AGCATCCAGCCCAACCTCACAATCATCT	9778	
	R: ATCCTTACCTCTGCTGCTGTGATGGCTC		
7q35-3	F: GCCATCACAGCAGCAGAGGTAAGGATCT	9468	
	R: GCTTTCCTCCTGCACTTGCTATCTCCCT		
8p22-1	F: CATGCCCTGTACTTCCCTGATCTCTCGG	9326	
	R: TCACAATCCCACTGCTGCTCATCAATCA		
8p22-2	F: TGATTGATGAGCAGCAGTGGGATTGTGA	9103	
	R: AAACAGAAGGCAGAGTGGTGGCGTAGAA		
8p22-3	F: ACTGGACTCTGCTCTCTCCATGTTTCCT	9299	
	R: ACCCCTGAAGGTTGCAGTATAAGCCTCT		
8p21.3-1	F: ATATACTGCTGCTTGGAGGGGGATGTGG	9351	
	R: CCTACACTGCTCAACAATCATGCCAGGT		
8p21.3-2	F: CTTCTCCACGTCTCAGTCCAATGCTGGT	9202	
	R: TTTTGCTTGGTGTCTTCTTCTGCTGGGT		
8p21.3-3	F: TAGTGCCTGTTTGGAGAAGGTGCTCAG	9456	
	R: TAAGGGTTGCTGCTGTTCACTGGGTGTA		

лции и интерстициальной дупликации, их размеров и геномной локализации. Ориентацию дупликации (прямая или инвертированная) установить таким методом не удастся. Так, например, в работе Ergün M.A. с соавт. обсуждается инвертированная ориентация

дупликации со смежной делецией 8p после проведенного ХМА [17], но такие результаты являются только гипотезой и требуют обязательного подтверждения. FISH является мощным инструментом молекулярной цитогенетики. Принцип метода FISH основан на спо-

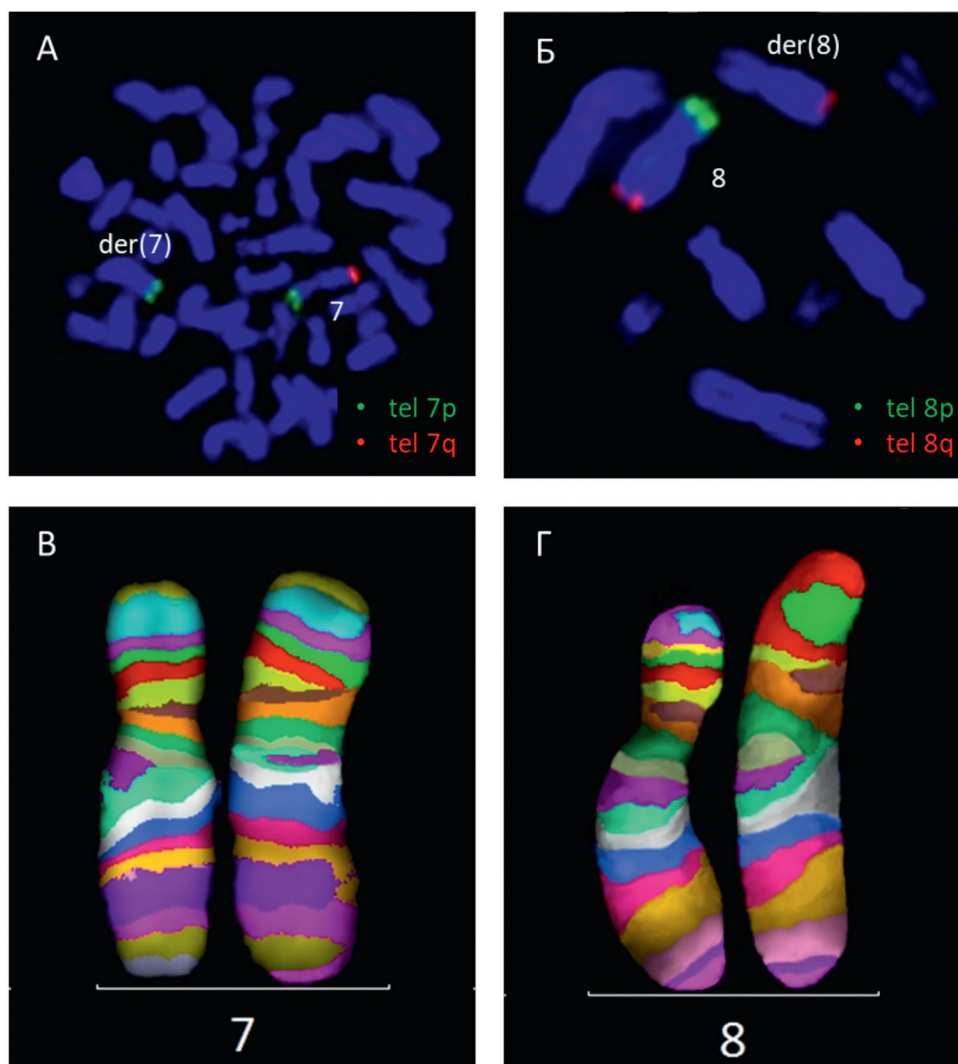


Рис. 1. Терминальная делеция 7q (А), терминальная делеция 8p (Б), установленные при FISH с коммерческими ДНК-зондами на соответствующие субтеломерные районы; результат многоцветный бэндинг хромосомы 7 (В) и хромосомы 8 (Г).

Примечание: В – Инвертированная дупликация 7(q34q35): слева – нормальный гомолог, справа – дериватная хромосома с хромосомным дисбалансом. Г – инвертированная дупликация 8(p23): слева – нормальный гомолог, справа – дериватная хромосома с хромосомным дисбалансом.

Fig. 1. Terminal deletion 7q (A), terminal deletion 8p (B), identified by FISH with commercial DNA probes on the corresponding subtelomeric regions; multicolor banding of chromosome 7 (C) and chromosome 8 (D).

Note: B – Inverted duplication 7(q34q35): on the left – a normal homologue, on the right – a derivative chromosome with a chromosomal imbalance. D – inverted duplication 8(p23): on the left – a normal homologue, on the right – a derivative chromosome with a chromosomal imbalance.

способности реассоциации денатурированной молекулы ДНК и комплементарном взаимодействии ДНК-зонда и ДНК-мишени [18]. В настоящее время этот подход позволяет использовать сотни доступных коммерческих ДНК-зондов [1, 19]. Однако в случаях, когда CNV не ассоциирована с известным микроделеционным/микродупликационным синдромом и не существует коммерческих локус-специфичных ДНК-зондов, для молекулярно-цитогенетической диагностики необходима разработка несерийных ДНК-зондов [7]. Для подготовки собственных (homemade) ДНК-зондов чаще всего используют клонированные в бактериальных искусственных хромосомах фрагменты ДНК (BAC – bacterial artificial chromosome clones), эти последовательности хорошо известны в геноме, соответственно отработка методики проведения FISH-анализа неплохо отражена в литературе [19]. Для определения инвертированной ориентации дуплицированного сегмента при inv dup del BAC-зонды также пользуются популярностью [13,20,21]. Применение олигонуклеотидов для получения несерийных ДНК-зондов встречается реже [22–24] ввиду необходимости подбора индивидуальных условий в каждом конкретном случае, что в итоге приводит к увеличению времени проведе-

ния анализа. Но несомненным плюсом использования ДНК-зондов на основе олигонуклеотидов является повсеместная доступность реактивов и соответственно низкая стоимость исследования. Использование именно такого подхода позволило нам при минимальных экономических затратах получить специфичный молекулярно-цитогенетический инструмент для решения вопроса об ориентации дуплицированного сегмента, т.е. локализации CNV не только по отношению к хромосоме, но и относительно друг друга.

Выводы

Разработка методов для верификации результатов ХМА является важной задачей медицинской генетики в рамках цитогеномного подхода. Совершенно очевидно, что использование единственного метода для диагностики CNV (а особенно сочетанных CNV) является недостаточным и может приводить к гиподиагностике ввиду отсутствия визуализации хромосомного дисбаланса (при ХМА или секвенировании экзома) или недостаточной разрешающей способности метода (при стандартном цитогенетическом исследовании) и, как следствие, неправильной интерпретации полученных

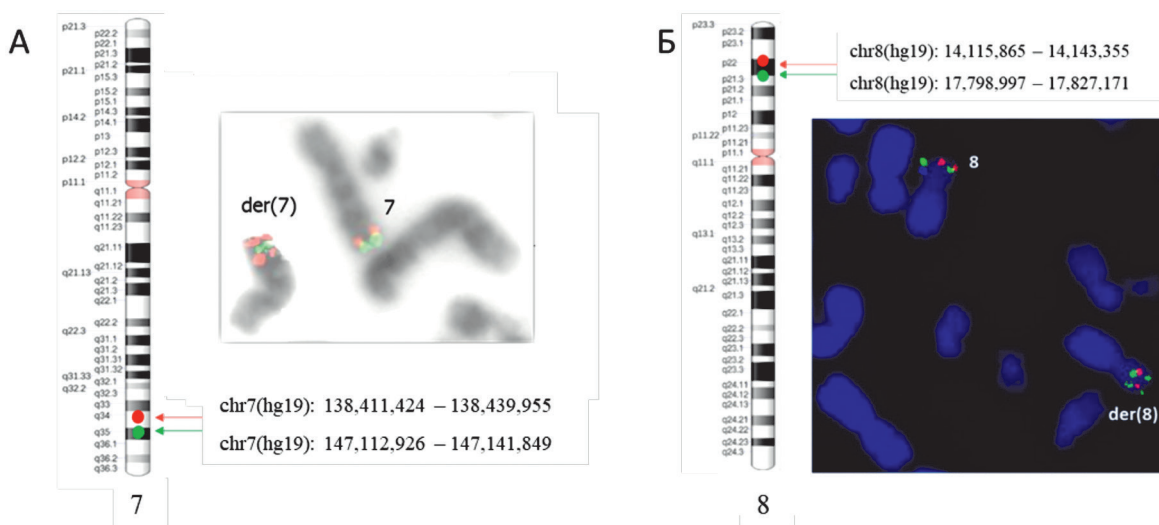


Рис. 2. А – несерийные ДНК-зонды для определения ориентации дуплицированного фрагмента 7q34q35. Б – несерийные ДНК-зонды для определения ориентации дуплицированного фрагмента 8p22.

Примечание: в обоих случаях последовательность расположения гибридизационных сигналов на дериватной хромосоме свидетельствует об инвертированности дупликации.

Fig. 2. А – Non-serial DNA probes to determine the orientation of the duplicated 7q34q35 fragment. Б – Non-serial DNA probes to determine the orientation of the duplicated 8p22 fragment.

Note: in both cases, the sequence of hybridization signals on the derivative chromosome indicates that the duplication is inverted.

результатов. В своей работе мы показали, что применение несерийных (homemade) ДНК-зондов позволяет расширить возможности верификации полученных результатов, учитывая персонифицированный подход к конкретным хромосомным перестройкам. Разработка отечественного продукта — отечественных ДНК-зондов является безусловно перспективным направлением, учитывая, что на сегодняшний день в России не налажено производство флуоресцентных ДНК-зондов.

Литература

- Liehr T. Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches. *Front Genet.* 2021; 13 (12): 720507.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S., Zelenova M.A., Vasin K.S., Demidova I.A. et al. Molecular cytogenetic and cytopostgenomic analysis of the human genome. *Research Results in Biomedicine.* 2022; 8 (4): 412-423.
- Silva M., de Leeuw N., Mann K., Schuring-Blom H., Morgan S., Giardino D., et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet.* 2019; 27 (1): 1-16. PubMed PMID: 30275486.
- Miller D.T., Adam M.P., Aradhya S., Biesecker L.G., Brothman A.R., Carter N.P., et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86 (5): 749-64.
- Battaglia A., Doccini V., Bernardini L., Novelli A., Loddo S., Capalbo A., et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013; 17 (6): 589-99. PubMed PMID: 23711909.
- Твеленёва А.А., Шилова Н.В. Методы верификации субмикроскопических клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК. *Медицинская генетика.* 2019; 18 (3): 26-38.
- Шилова Н.В., Миньженкова М.Е. Интерпретация клинически значимых вариаций числа копий ДНК. *Медицинская генетика.* 2018; 17 (10): 15-19.
- McGowan-Jordan J., Hastings R. J., Moore S, editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Basel: Hartford: Karger; 2020.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 134.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Systems Cytogenomics: Are We Ready Yet? *Curr Genomics.* 2021; 22 (2): 75-78.
- Dill F.J., Schertzer M., Sandercock J., Tischler B., Wood S. Inverted tandem duplication generates a duplication deficiency of chromosome 8p. *Clin Genet.* 1987; 32 (2): 109-13.
- Zuffardi O., Bonaglia M., Ciccone R., Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements?? *Clin Genet.* 2009; 75 (6): 505-13.
- Shimokawa O., Kurosawa K., Ida T., Harada N., Kondoh T., Miyake N., et al. Molecular characterization of inv dup del(8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet A.* 2004; 128A (2): 133-7.
- Garcia-Santiago F.A., Martinez-Glez V., Santos F., Garcia-Miñaur S., Mansilla E., Meneses A.G., et al. Analysis of invdupdel(8p) rearrangement: Clinical, cytogenetic and molecular characterization. *Am J Med Genet A.* 2015; 167A (5): 1018-25.
- Rowe L.R., Lee J.Y., Rector L., Kaminsky E.B., Brothman A.R., Martin C.L., et al. U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements. *J Med Genet.* 2009; 46 (10): 694-702.
- Yu S., Graf W.D. Telomere capture as a frequent mechanism for stabilization of the terminal chromosomal deletion associated with inverted duplication. *Cytogenet Genome Res.* 2010; 129 (4): 265-74.
- Ergün MA, Kula S, Karaer K, Perçin EF. A case with de novo inv dup del(8p) associated with dextrocardia and corpus callosum agenesis. *Pediatr Int.* 2010; 52 (5): 845-6.
- Pinkel D., Gray J.W., Trask B., van den Engh G., Fuscoe J., van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51 (1): 151-7.
- Liehr T. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) — Application Guide. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer. 2017
- Fontana P., Bernardini L., Lombardi C., Giuffrida M.G., Ciavarella M., Capalbo A., et al. De Novo Inverted Duplication Deletion of 4p in a 14-Week-Old Male Fetus Aborted Due to Multiple Anomalies. *J Pediatr Genet.* 2021; 10 (3): 245-249.
- Chen C.P., Ko T.M., Wang L.K., Chern S.R., Wu P.S., Chen S.W., et al. Inv dup del(10p): Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2019; 58 (5): 698-703.
- Жигалина Д.И., Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Лопаткина М.Е., Васильев С.А., Сивоха В. М., и др. FISH -диагностика хромосомной транслокации с использованием технологии синтеза locus-специфичных ДНК-зондов на основе ПЦР длинных фрагментов. *Генетика.* 2020; 56 (6): 704-713.
- Minzhenkova M.E., Yurchenko D.A., Semenova N.A., Markova Z.G., Tarlycheva A.A., Shilova N.V. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genet. Mol. Res.* 2022; 21(4): GMR19065.
- Юрченко Д.А., Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Дадала Е.Л., Шилова Н.В. Комплексный подход к изучению структуры и происхождения дериватной хромосомы 8. *Медицинская генетика.* 2021; 20 (6): 41-50.

References

- Liehr T. Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches. *Front Genet.* 2021; 13 (12): 720507.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S., Zelenova M.A., Vasin K.S., Demidova I.A. et al. Molecular cytogenetic and cytopostgenomic analysis of the human genome. *Research Results in Biomedicine.* 2022; 8 (4): 412-423.
- Silva M., de Leeuw N., Mann K., Schuring-Blom H., Morgan S., Giardino D., et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet.* 2019; 27 (1): 1-16. PubMed PMID: 30275486.
- Miller D.T., Adam M.P., Aradhya S., Biesecker L.G., Brothman A.R., Carter N.P., et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86 (5): 749-64.
- Battaglia A., Doccini V., Bernardini L., Novelli A., Loddo S., Capalbo A., et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013; 17 (6): 589-99. PubMed PMID: 23711909.
- Tveleneva A.A., Shilova N.V. Metody verifikatsii submikroskopicheskikh klinicheskikh znachimykh variatsiy chisla kopiy uchastkov DNK

- [Methods for verification of submicroscopic pathogenic copy number variations]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2019;18(3):26-38. (In Russ.)
7. Shilova N.V., Minzhenkova M.E. Interpretatsiya klinicheski znachimykh variatsiy chisla kopiy DNK [Interpretation of pathogenic copy number variations]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2018;17(10):15-19. (In Russ.)
 8. McGowan-Jordan J., Hastings R. J., Moore S, editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Basel: Hartford: Karger; 2020.
 9. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134.
 10. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Systems Cytogenomics: Are We Ready Yet? *Curr Genomics*. 2021; 22 (2): 75-78.
 11. Dill F.J., Schertzer M., Sandercock J., Tischler B., Wood S. Inverted tandem duplication generates a duplication deficiency of chromosome 8p. *Clin Genet*. 1987; 32 (2): 109-13.
 12. Zuffardi O., Bonaglia M., Ciccone R., Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements?? *Clin Genet*. 2009; 75 (6): 505-13.
 13. Shimokawa O., Kurosawa K., Ida T., Harada N., Kondoh T., Miyake N., et al. Molecular characterization of inv dup del(8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet A*. 2004; 128A (2): 133-7.
 14. Garcia-Santiago F.A., Martinez-Glez V., Santos F., Garcia-Miñaur S., Mansilla E., Meneses A.G., et al. Analysis of invdupdel(8p) rearrangement: Clinical, cytogenetic and molecular characterization. *Am J Med Genet A*. 2015; 167A (5): 1018-25.
 15. Rowe L.R., Lee J.Y., Rector L., Kaminsky E.B., Brothman A.R., Martin C.L., et al. U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements. *J Med Genet*. 2009; 46 (10): 694-702.
 16. Yu S., Graf W.D. Telomere capture as a frequent mechanism for stabilization of the terminal chromosomal deletion associated with inverted duplication. *Cytogenet Genome Res*. 2010; 129 (4): 265-74.
 17. Ergün MA, Kula S, Karaer K, Perçin EF. A case with de novo inv dup del(8p) associated with dextrocardia and corpus callosum agenesis. *Pediatr Int*. 2010; 52 (5): 845-6.
 18. Pinkel D., Gray J.W., Trask B., van den Engh G., Fuscoe J., van Deken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 51 (1): 151-7.
 19. Liehr T. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) – Application Guide. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer. 2017
 20. Fontana P., Bernardini L., Lombardi C., Giuffrida M.G., Ciavarella M., Capalbo A., et al. De Novo Inverted Duplication Deletion of 4p in a 14-Week-Old Male Fetus Aborted Due to Multiple Anomalies. *J Pediatr Genet*. 2021; 10 (3): 245-249.
 21. Chen C.P., Ko T.M., Wang L.K., Chern S.R., Wu P.S., Chen S.W., et al. Inv dup del(10p): Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019; 58 (5): 698-703.
 22. Zhigalina D.I., Skryabin NA, Vasilieva OJ, Lopatkina ME, Vasiliev SA, Sivokha VM, et al. FISH diagnostics of chromosomal translocation with the technology of synthesis of locus-specific DNA probes based on long-range PCR. *Russian Journal of Genetics*. 2020;56(6): 739-746.
 23. Minzhenkova M.E., Yurchenko D.A., Semenova N.A., Markova Z.G., Tarlycheva A.A., Shilova N.V. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genet. Mol. Res*. 2022; 21(4): GMR19065.
 24. Yurchenko D.A., Minzhenkova M.E., Markova Z.G., Dadali E.L., Shilova N.V. Kompleksnyj podhod k izucheniju struktury i proishozhdeniya derivatnoj hromosomy 8 [Complex approach to the study of the Derivative Chromosome 8]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2021;20(6):41-50. (In Russ.)