

На правах рукописи

**ЮРОВ
ИВАН ЮРЬЕВИЧ**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ ПРИ
НЕРВНО-ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

03.02.07 — Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

МОСКВА-2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук «Научный центр психического здоровья» РАМН.

Официальные оппоненты: Академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор,
Бочков Николай Павлович

доктор биологических наук, профессор
Лимборская Светлана Андреевна

доктор биологических наук,
Волгарева Галина Михайловна

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии Наук
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

Защита состоится «_____» _____ 2011 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.016.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Медико-генетическом научном центре РАМН по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук Медико-генетического научного центра РАМН по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор

Р. А. Зинченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Одной из наиболее значимых особенностей генома человека является его широкая вариабельность, обусловленная качественными и количественными изменениями последовательности хромосомной ДНК. Геномные вариации проявляются в виде изменений ДНК на всех основных уровнях организации генетического материала: первичной последовательности нуклеотидов ДНК (генные мутации, экспансии микро- и минисателлитных повторов), субмикроскопическом (хромосомные микроперестройки) и микроскопическом (структурные и численные аномалии хромосом) (Ворсанова и др., 2006; Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004; Feuk et al., 2006; Redon et al., 2006; Sharp et al., 2006). Исследования последних нескольких лет показали, что геномные вариации затрагивают не менее 12% всех эухроматиновых (генонасыщенных) участков хромосом человека (Redon et al., 2006). С другой стороны, изменения последовательностей геномной ДНК являются причиной или факторами предрасположенности к различным наследственным заболеваниям, и имеют достаточно высокую частоту в общей популяции (Ворсанова и др., 2006; Feuk et al., 2006; Zhang et al., 2009). Большинство патологических состояний, связанных со структурными изменениями хромосомной ДНК, характеризуется нарушениями развития и функционирования центральной нервной системы (ЦНС). Геномные перестройки, выявляемые на субмикроскопическом и микроскопическом уровнях, являются одной из наиболее частых причин нервных и психических заболеваний, а при некоторых мультифакторных болезнях ЦНС специфические вариации генома имеют значительно более высокую частоту по сравнению с контролем (Ворсанова и др., 2000; 2006; Knight, Regan, 2006; Cook, Scherer, 2008). Эти открытия в области генетики человека и медицинской генетики явились результатом изучения межиндивидуальных вариаций последовательностей геномной ДНК эухроматина. Однако, вариабельность генома человека на межклеточном уровне (соматические геномные вариации или СГВ), а также в клетках разных тканей остается практически неизученной. Подобное утверждение справедливо и по отношению к гетерохроматиновым участкам хромосом человека, которые составляют около 20% всего генома и также демонстрируют исключительную межиндивидуальную изменчивость (Ворсанова и др., 2006; Lander et al., 2001; Li et al., 2001; Venter et al., 2001). Предполагается, что это является следствием отсутствия соответствующих молекулярных технологий анализа повторяющихся последовательностей ДНК, формирующих гетерохроматиновые участки генома человека (Юров, Ворсанова, 2001).

Другой формой вариабельности генома является изменения его функциональной активности или эпигенетические феномены, обусловленные на молекулярном уровне химическими модификациями последовательностей ДНК и хроматина. На клеточном уровне эпигенетические феномены проявляются в виде вариаций организации и расположения хромосом, специфических участков генома и генных локусов в интерфазном ядре (van Driel et al., 2003; Teller et al., 2007; Hirst, Mara, 2009). Следует отметить, что анализ эпигенетических процессов, в основном, проводится на фракциях молекул ДНК, РНК и белков, выделенных из большого числа клеток. Это, как правило, приводит к тому, что большинство исследований не учитывает межклеточные вариации активности генома. Тем не менее, как показано с помощью оценки профиля транскрипции индивидуальных клеток, отсутствие таких данных не позволяет полноценно охарактеризовать «эпигеном» человека (Levsky, Singer, 2002).

Эпигенетические феномены, проявляющиеся на хромосомном (супрамолекулярном) уровне, изучаются в каждой отдельно взятой клетке. Однако из-за объективных методических ограничений комплекс соответствующих внутриклеточных генетических и эпигенетических процессов остается малоизученным (Gondor, Ohlsson, 2009). Более того, многие типы соматических клеток человека, в частности, клетки головного мозга, в норме и при различных заболеваниях ЦНС никогда не исследовались в данном аспекте.

Таким образом, в настоящее время особенности структурно-функциональной организации и вариабельности генома человека в соматических клетках изучены недостаточно полно. Это связано с методическими ограничениями молекулярных технологий, как для идентификации соматических геномных вариаций, так и для анализа структуры хромосом в неделящихся клетках соматических тканей человека. Последнее становится особо актуальным в свете изучения головного мозга и заболеваний, связанных с нарушениями его функциональной активности. С одной стороны, нервные клетки головного мозга практически не исследовались с помощью современных высокоразрешающих методов анализа интерфазных хромосом. С другой стороны, высокая социальная значимость болезней ЦНС и их предполагаемая связь с генетическими (эпигенетическими) внутриклеточными процессами свидетельствуют о необходимости разработки новых подходов к исследованию генома при нервных и психических заболеваниях. Анализ соматических вариаций и нестабильности генома в клетках головного мозга на хромосомном уровне может рассматриваться в качестве возможной альтернативы. Помимо этого, для изучения механизмов возникновения вариаций и нестабильности генома в соматических неделящихся клетках ЦНС необходимы онтогенетические исследования. Идентификация генетической и эпигенетической вариабельности и нестабильности генома (эпигенома) в клетках ЦНС представляется актуальной задачей молекулярной генетики и цитогенетики, решение которой затруднено исключительной сложностью организации головного мозга на клеточном уровне. Наиболее значимыми биологическими маркерами нестабильности генома в неделящихся клетках, в том числе и в мозге, которые можно исследовать современными методами молекулярной цитогенетики, являются численные хромосомные аномалии или анеуплоидия (Юров, Ворсанова, 2001). Исследования в этой области тесно связаны с проблемой выявления хромосомного мозаицизма в соматических тканях в норме и при патологии. Необходимо отметить, что, используя современные методы цитогенетического анализа, мозаицизм можно выявить лишь при наличии 10-20% аномальных клеток. Однако исключить наличие соматического мозаицизма в разных тканях в принципе невозможно из-за неравномерного распределения мозаичных клеток или феномена низкопроцентного мозаицизма (Youssoufian, Pyeritz, 2002).

На современном этапе развития медицинской генетики (нейрогенетики и психиатрической генетики) существует необходимость разработки новых, молекулярно-цитогенетических технологий для изучения нестабильности генома на хромосомном уровне в неделящихся нервных клетках. Достижения в этой области могут лечь в основу исследований особенностей структурно-функциональной организации генома в клетках мозга при генетически обусловленных нервных и психических заболеваниях. Результатом подобных исследований будут новые данные о возможных молекулярных и клеточных механизмах патогенеза болезней ЦНС, которые необходимы для создания новых методов молекулярной диагностики,

эффективного медико-генетического консультирования и научно-обоснованного лечения этих заболеваний.

Цель и задачи исследования

Основной целью настоящей работы являлось изучение особенностей структурно-функциональной организации и нестабильности хромосом в клетках головного мозга на разных стадиях онтогенеза, а также при нервных и психических заболеваниях: аутизм, шизофрения, атаксия-телеангиэктазия (АТ или синдром Луи-Бар) и болезнь Альцгеймера (БА). Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработать комплекс молекулярно-цитогенетических методов анализа особенностей структурной и функциональной организации генома различных типов клеток на микроскопическом и субмикроскопическом уровнях, включая определение низкопроцентного хромосомного мозаицизма как биологического маркера нестабильности генома в неделящихся клетках головного мозга человека.
2. Определить спонтанный уровень анеуплоидии в эмбриональных нервных клетках головного мозга человека, а также в условиях культивирования *in vitro*.
3. Определить спонтанный уровень анеуплоидии в нервных клетках головного мозга нормальных индивидуумов (кора больших полушарий, мозжечок, гиппокамп).
4. Выявить частоту мозаичных форм анеуплоидии у детей с аутизмом и умственной отсталостью.
5. Определить уровень мозаичной анеуплоидии в нервных клетках головного мозга (кора больших полушарий, мозжечок, гиппокамп) у индивидуумов с шизофренией.
6. Определить уровень мозаичной анеуплоидии и структурных хромосомных перестроек в нервных клетках головного мозга (кора больших полушарий, мозжечок) при АТ (синдроме мозжечковой нейродегенерации раннего возраста и хромосомной нестабильности).
7. Определить уровень мозаичной анеуплоидии в нервных клетках головного мозга (кора больших полушарий, гиппокамп, мозжечок) в случае нейродегенерации позднего возраста при БА.
8. Исследовать изменения структурно-функциональной организации генома в интерфазных ядрах клеток головного мозга на примере феномена соматического спаривания хромосом в норме, а также при нервно-психических болезнях на примере шизофрении, БА и АТ.
9. На основе сравнительного анализа особенностей структурно-функциональной организации генома в нервных клетках головного мозга в норме и при заболеваниях ЦНС предложить возможные механизмы патогенеза аутизма, шизофрении, БА и АТ, а также разработать рекомендации для диагностики, профилактики и повышения эффективности медико-генетического консультирования при этих заболеваниях.

Научная новизна

Разработан комплекс молекулярно-цитогенетических методов для выявления биологических маркеров геномной нестабильности (мозаичной анеуплоидии и структурных хромосомных перестроек) в клетках головного мозга человека. Комплекс методов включает оригинальные модификации многоцветовой интерфазной флюоресцентной гибридизации *in situ* (mFISH), количественной FISH (QFISH), полимеразной реакции *in situ* (PRINS), интерфазного многоцветового

хромосомспецифического окрашивания (ICS-MCB), иммуно-FISH (метод, сочетающий иммунотипирование клеток и FISH), а также оригинальный биоинформатический метод анализа генного дисбаланса при хромосомных перестройках.

Впервые выявлен феномен геномной и хромосомной нестабильности при эмбриональном развитии мозга человека. Обнаружен феномен хромосомного мозаицизма, ограниченного тканями мозга. Определены частоты спонтанной анеуплоидии в клетках разных тканей эмбриона человека (ЦНС, кожи, ворсин хориона), составляющие от 20% до 35%. Выявлен феномен индуцированной мозаичной анеуплоидии в органотипических культурах эмбриональных и фетальных нервных клетках человека в условиях *in vitro*.

Впервые определены частоты спонтанной анеуплоидии для разных хромосом и вариации хромосомного набора в клетках нормального головного мозга индивидуумов без нарушений психики. Определена доля анеуплоидных клеток в нормальном взрослом мозге человека, составляющая около 0,5% в расчете на хромосому. Получены данные в пользу редукции мозаичной анеуплоидии в ходе развития ЦНС от 30-35% в эмбриональном периоде до 10-12% во взрослом мозге.

Впервые показано, что при шизофрении вариации хромосомного набора в виде низкопроцентной мозаичной анеуплоидии имеют повышенную частоту в клетках головного мозга по сравнению с контролем.

Впервые представлены данные о частоте хромосомных аномалий у детей с идиопатическим аутизмом при учете соматических (мозаичных) геномных вариаций, микроперестроек, хромосомной нестабильности и определена частота мозаичных форм анеуплоидии, достигающая 16%.

Впервые продемонстрировано, что при БА мозаичная анеуплоидия с участием хромосомы 21 специфически поражает нервные клетки отделов головного мозга, подверженных дегенерации (гиппокамп и кора больших полушарий), являясь, таким образом, одним из возможных генетических механизмов патогенеза этого заболевания.

Впервые обнаружено, что при АТ (синдром Луи-Бар) мозжечковая нейродегенерация связана с мозаичным эффектом хромосомной нестабильности в виде анеуплоидии и структурных хромосомных aberrаций, селективно поражающих нервные клетки определенных областей головного мозга (мозжечка).

Впервые охарактеризована ядерная организация гомологичных хромосом в интерфазных клетках головного мозга, и показано, что она определяется процессом соматических ассоциаций (спаривания) хромосомных локусов, дифференциально затрагивающих гетерохроматиновые участки разных хромосом. Определены частоты соматического спаривания хромосом и показано нарушение правила «хромосомных территорий» для определенных гомологичных хромосом в нейронах коры и мозжечка головного мозга человека.

Впервые исследованы особенности архитектоники интерфазного ядра клеток головного мозга в норме и при психической патологии, а также представлены данные о том, что характерные изменения ядерной организации генома (эпигенома) и нарушения соматического спаривания эухроматиновых участков хромосом в нервных клетках наблюдаются у больных с психическими заболеваниями (шизофрения и БА). Таким образом, нарушения соматического спаривания эухроматиновых участков хромосом могут являться одним из вероятных эпигенетических механизмов патогенеза этих болезней.

На основе полученных данных предложена оригинальная гипотеза о дифференциальной экспрессии нестабильности генома (эпигенома) в клетках ЦНС, объясняющая возможные генетические механизмы патогенеза различных нервно-психических заболеваний (аутизм, шизофрения, БА и АТ). Разработана комплексная схема патогенеза исследованных заболеваний, основанная на данных о соматических вариациях и нестабильности структурно-функциональной организации генома на хромосомном уровне.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные о соматических вариациях и нестабильности генома, а также особенностях его структурно-функциональной организации на хромосомном уровне в клетках головного мозга на разных стадиях онтогенеза и при нервно-психической патологии имеют фундаментальное значение и могут быть рекомендованы для использования в курсах лекций по разным разделам медицинской генетики, биологии развития, клеточной биологии и нейробиологии при подготовке специалистов в высших учебных заведениях медико-биологического профиля, а также включены в руководства и учебные пособия по данным специальностям.

В ходе работы было создано новое научное направление в современной экспериментальной биологии и биомедицине — молекулярная нейроцитогенетика, которая сочетает в себе методические аспекты генетики человека (молекулярной цитогенетики) и клеточной нейробиологии и изучает особенности организации и функционирования генома на супрамолекулярном уровне в клетках ЦНС. Цель этого направления — интегрировать знания о геноме на клеточном и молекулярном уровнях в норме и при патологии мозга, а также использовать их в контексте клинической, диагностической и терапевтической практики.

Разработанный комплекс молекулярно-цитогенетических методов для выявления особенностей структурной и функциональной организации генома на хромосомном уровне в клетках ЦНС имеет практическую значимость для поиска новых биологических и диагностических маркеров различных форм нейродегенеративных и психических заболеваний.

Выявление геномных и хромосомных нарушений при аутизме, идиопатической умственной отсталости, шизофрении и БА позволит разработать новые подходы к дифференциальной клиничко-лабораторной диагностике и медико-генетическому консультированию при этих широко распространенных заболеваниях ЦНС.

Результаты настоящей работы могут быть использованы для разработки новых методов молекулярной терапии с учетом патогенетических процессов, происходящих в клетках головного мозга при аутизме, недифференцированных формах умственной отсталости, шизофрении, БА и АТ.

Основные положения, выдвигаемые на защиту

1. С помощью разработанного комплекса молекулярно-цитогенетических методов (MFISH, QFISH, ICS-MCB, Иммуно-FISH) и оригинального биоинформатического метода исследованы структурно-функциональные особенности организации хромосом и соматические геномные вариации на хромосомном уровне в постмитотических клетках головного мозга человека.
2. Молекулярно-цитогенетический анализ нервных клеток головного мозга и других тканей человека в норме и при различных заболеваниях ЦНС, включая аутизм, шизофрению, АТ и БА, свидетельствует о том, что мозаичная анеуплоидия является одним из наиболее значимых биологических маркеров нестабильности генома при нервных и психических болезнях.

3. Эмбриональный мозг человека характеризуется повышенным уровнем мозаичной анеуплоидии, составляющим 30-35%; в ходе внутриутробного и постнатального развития ЦНС происходит редукция числа аномальных клеток до 10-12%, что свидетельствует в пользу существования онтогенетических геномных и хромосомных вариаций в соматических тканях человека.
4. При аутизме наблюдается повышенная частота соматических и межиндивидуальных вариаций генома в виде мозаичных форм хромосомных аномалий (нестабильности) с вовлечением хромосом X, 9 и 15 и хромосомных вариантов в виде гетероморфизма гетерохроматиновых участков. На основе высокоразрешающего молекулярно-цитогенетического и биоинформатического исследований структурных геномных перестроек определены гены-кандидаты этого заболевания.
5. В клетках коры больших полушарий головного мозга при шизофрении выявлена повышенная частота соматических геномных вариаций, проявляющихся в виде спорадической анеуплоидии и низкопроцентного хромосомного мозаицизма по хромосомам 1, а также хромосом 18 и X. Обнаружение геномной нестабильности в виде анеуплоидии в мозге согласуется с «онтогенетической» и «нейродегенеративной» гипотезами шизофрении.
6. Полученные данные позволяют выделить диагностические маркеры нарушения психики при аутистических расстройствах и шизофрении, связанные с мозаичными формами хромосомных аномалий и нестабильности, а также специфическими межиндивидуальными вариациями генома.
7. При нейродегенеративных заболеваниях раннего и позднего возраста (АТ и БА, соответственно) наблюдается дифференциальная экспрессия хромосомной нестабильности и мозаичной анеуплоидии в пораженных участках мозга. При АТ наблюдалась глобальная экспрессия анеуплоидии в клетках головного мозга, затрагивающая до 20-50% нейронов коры и мозжечка, а в дегенерирующем мозжечке выявлена локальная нестабильность хромосомы 14 в виде анеуплоидии и разрывов в участке 14q12. При БА выявлено 10-ти-кратное увеличение уровня анеуплоидии по хромосоме 21 в отделах мозга, подверженных нейродегенерации (кора полушарий и мозжечок).
8. Нестабильность генома и хромосом в клетках головного мозга является одним из возможных генетических механизмов таких распространенных нервных и психических заболеваний как аутизм, шизофрения, АТ и БА.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на всемирных конгрессах международного общества психиатрической генетики (ISPG): Монтерей, США (1999), Дублин, Ирландия (2004), Кальяри, Италия (2006); на всемирном конгрессе по синдрому Ретта, Каруизава, Япония (2000); на конференциях Европейской цитогенетической ассоциации (ЕСА): Париж, Франция (2001), Болонья, Италия (2003), Стамбул, Турция (2007), Стокгольм, Швеция (2009); на 14-ой международной хромосомной конференции, Вюрцбург, Германия (2001); на конференции «Обеспечение помощи людям с синдромом Ретта», Лондон, Англия (2002); на ежегодных конференциях Европейского общества генетики человека: Страсбург, Франция (2002), Прага, Чехия (2005), Ницца, Франция (2007), Барселона, Испания (2008), Вена, Австрия (2009); на II, III, IV, V, VI, VII и VIII конгрессах «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва (2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008 и 2009, соответственно); на 54-ом ежегодном конгрессе

Американского общества генетики человека, Торонто, Канада (2004); на II и III конференциях глобального колледжа нейропротекции и нейрогенерации: Зерматт, Швейцария (2004), Упсала, Швеция (2006); на III и IV съездах Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС), Москва (2004 и 2009, соответственно); на 14-ом съезде, посвященном клеткам плода и их ДНК (Fetal Cells and DNA), Йена, Германия (2004); на конференции «Современные достижения генетических исследований: клинические аспекты», Ростов-на-Дону (2004); на 2-х конгрессах «Национальные дни лабораторной медицины», Москва (2004 и 2008); на съезде Российского общества медицинских генетиков, Уфа (2005); на IX, XI, XII и XVI съездах педиатров России, Москва (2005, 2007, 2008, 2009, соответственно); на Европейской цитогенетической конференции, Мадрид, Испания (2005); на XIV съезде психиатров России, Москва (2005); на 3-ей конференции французской ассоциации медицинской генетики, Монпелье, Франция (2006); на VII и VIII Балканских конференциях генетики человека: Скопье, Македония (2006), Цавтат, Хорватия (2009), соответственно; на конференции «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии», Курск (2006); на XIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва (2006); на всероссийской конференции-выставке «Высокие медицинские технологии - Медицинский госзаказ», Москва (2006); на XX съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова, Москва (2007); на конференции «Актуальные проблемы медицинской генетики», Киев, Украина (2007); на конференциях Немецкого общества генетики, Йена, Германия (2007, 2010); на Европейском съезде участников проектов INTAS, Киев, Украина (2007); на 14-ом Всемирном конгрессе патофизиологии, Санкт-Петербург (2008); на IV съезде медицинских генетиков Украины, Львов (2008); на конгрессах организации генома человека (HUGO), Хайдарабад, Индия (2008), Монпелье, Франция (2010); на конференции «Плод, как часть семьи», Одесса, Украина (2009); на международной конференции «Хромосома 2009», Новосибирск (2009); на всемирной конференции-выставке по молекулярной диагностике, Пекин, Китай (2009); на третьем международном медицинском форуме-выставке «Индустрия Здоровья», Москва (2010); на конференции НЦПЗ РАМН «Биологическая психиатрия — клинической психиатрии», Москва (2010), на VI съезде Российского общества медицинских генетиков, Ростов-на-Дону (2010), а также на многочисленных научных семинарах в различных научно-исследовательских учреждениях России, Германии и Франции.

Внедрение. Результаты по разработке молекулярно-цитогенетических методов применяются для диагностики хромосомных аномалий и геномных перестроек в Московском НИИ педиатрии и детской хирургии, Минздравсоцразвития РФ и НУЦ «Нейробиологическая диагностика наследственных психических заболеваний детей и подростков» Московского городского психолого-педагогического университета. Данные, полученные в ходе настоящей работы, используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, на кафедре медицинской генетики Российской академии последипломного образования, на факультете клинической и специальной психологии Московского городского психолого-педагогического университета.

Публикации по теме работы. По теме диссертации опубликовано 132 работы: 1 монография, 50 оригинальных статей и 22 обзорные статьи в рецензируемых отечественных и международных научных журналах (монографиях), а также 60 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 669 ссылок на оригинальные статьи и монографии (40 и 629 работ в отечественной и зарубежной печати, соответственно, а также 16 Интернет-ресурсов). Работа изложена на 355 страницах машинописного текста и содержит 85 иллюстраций и 50 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом цитогенетических исследований явился 1781 образец лимфоцитов периферической крови детей с умственной отсталостью и ВПР, среди которых 160 имели клинический диагноз «аутизм». Помимо этого, были также исследованы образцы лимфоцитов периферической крови 60-ти детей без клинических проявлений психических заболеваний в качестве контроля для изучения низкопроцентного мозаицизма, 93-х родителей детей с умственной отсталостью и ВПР, а также 98-ми матерей детей с аутизмом. Эмбриональные ткани, используемые в настоящей работе, были получены из 715 образцов спонтанных абортусов (срок 5-15 недель) женщин в возрасте от 16 до 47 лет (средний возраст 31 год), 12 образцов медицинских абортусов (срок 7-12 недель), у которых исследовали клетки тканей мозга, кожи и ворсин хориона, а также 6-ти образцов культивируемых *in vitro* клеток эмбрионального мозга (органотипические культуры). Изучение структурно-функциональной организации хромосом проводилось с помощью анализа 18 образцов тканей головного мозга пациентов с шизофренией, 14 образцов тканей головного мозга пациентов с БА, 7 образцов тканей головного мозга пациентов с АТ, а также 36 контрольных образцов головного мозга. Исследовались ткани коры головного мозга (поля Бродманна 4, 5, 10, 17 и 24), хвостатого ядра, мозжечка и гиппокампа. Исследования одобрены этическим комитетом Научного центра психического здоровья РАМН и проводились с учетом международных этических и правовых норм исследований в области генетики, психиатрии, нейробиологии и эмбриологии (Boer, 1994; McGuffin et al., 2004).

В работе использовались цитогенетические, молекулярно-цитогенетические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы, а также проводилась статистическая обработка результатов. При анализе метафазных хромосом, полученных из клеток лимфоцитов периферической крови, использовались методы G- и C-окрашивания. Молекулярно-цитогенетические исследования метафазных и интерфазных хромосом проводились с использованием различных модификаций (включая оригинальные) методов FISH, многоцветового окрашивания хромосом (MCB/ICS-MCB), метафазной CGH, серийной CGH (array CGH), PRINS, PNA и иммуно-FISH. В общей сложности при проведении анализа интерфазных хромосом было исследовано более 12 миллионов клеток. Молекулярно-генетические методы использовались для определения родительского происхождения дополнительной хромосомы у детей с синдромом Дауна, а также для оценки ее влияния на эпигеном с помощью анализа особенностей инактивации хромосомы X в клетках индивидуумов с трисомией хромосомы 21 и их матерей. Для идентификации генов и ДНК последовательностей, оценки степени «патогенности» геномных перестроек, определения особенностей геномной организации, связанной со структурными вариациями генома, а также определения эффекта вариаций интерфазной организации хромосом в настоящей работе был предложен оригинальный биоинформатический метод, который сочетал в себе сравнительный анализ геномных

и эпигенетических баз данных, а также построение интерактивных (взаимодействие белковых молекул) и реактивных (каскад метаболических реакций) цепочек на основе молекулярно-цитогенетических данных относительно структурных и функциональных вариаций хромосомных участков. В настоящей работе применяли стандартные методы статистической обработки для медико-биологических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-цитогенетический и биоинформатический анализ структурной и функциональной организации хромосом

При проведении настоящего исследования возникла необходимость решения нескольких технических задач, которые были связаны с тем, что современные молекулярно-цитогенетические технологии исследования интерфазных клеток ограничены анализом специфических последовательностей ДНК без возможности изучения всей хромосомы, а также разрешения метафазной CGH, не позволяющей идентифицировать геномные микроперестройки. Для решения этих задач были предложены оригинальные методы хромосомоспецифического многоцветового окрашивания (ICS-MCB), QFISH, многоцветовой иммуно-FISH/ICS-MCB с использованием антител NeuN и высокоразрешающей CGH (HR-CGH). Было показано, что ICS-MCB имеет высокую эффективность при анализе интерфазных клеток, а также является единственным методом, позволяющим визуализацию целых хромосом с разрешением до хромосомного участка в интерфазных ядрах. Эффективность метода QFISH оценивалась посредством измерения гетероморфизма альфоидных или классических сателлитных ДНК в метафазных пластинках и интерфазных ядрах лимфоцитов периферической крови (n=100), ворсин хориона (n=50), эмбриональной кожи (n=12), плаценты (n=5) и нейронов головного мозга (n=30). В результате проведенного исследования было показано, что он может с успехом применяться для корректной интерпретации результатов FISH, открывая уникальную возможность идентификации низкопроцентного хромосомного мозаицизма и соматических геномных вариаций. Используя иммуно-MFISH, представляющую собой иммунотипирование нейронов с помощью антител NeuN и последующей трехцветовой FISH, было показано, что этот метод является в значительной степени эффективным для определения хромосомных аномалий в специфических типах клеток (нейронах), а также изучения функциональной хромосомной организации в интерфазных ядрах клеток головного мозга. Модификация метафазной CGH позволила увеличить разрешение этого метода до 1 млн пн.

Предложен оригинальный метод *in silico* для анализа геномных локусов, участвующих в хромосомных перестройках и/или демонстрирующих особую организацию в интерфазных ядрах, основанный на изучении экспрессии генов, представленных в геномных и эпигенетических базах данных (NCBI Build 37.1, ENSEMBL, BioGPS, GNF SymAtlas v1.2.4) (Wu et al., 2009). Белки, кодируемые генами, демонстрировавшими повышенную экспрессию в пораженных или исследованных тканях, изучали с помощью интерактивного и реактивного анализа. *In silico* анализ был с успехом использован для определения генов-кандидатов и «процессов-мишеней» при изучении хромосомных перестроек у детей с аутизмом и умственной отсталостью, исследованных методами HR-CGH или серийной CGH, механизмов образования хромосомных перестроек, а также функциональных

последствий особенности организации геномных локусов (хромосомных участков) в интерфазных клетках головного мозга.

Применение методов ICS-MCB, QFISH и Immuno-FISH (Immuno-MFISH), а также их сочетание с ранее известными методиками интерфазной MFISH позволили предложить комплексный молекулярно-цитогенетический подход к определению соматических вариаций генома и хромосомного мозаицизма в ядрах интерфазных клеток с эффективностью 99,5%. Данный комплекс методов, который включал в себя детекцию хромосомного мозаицизма в отличие от ранее описанных аналогов, был апробирован и интегрирован в схему диагностики хромосомных аномалий и микроперестроек. Показано, что предлагаемый алгоритм диагностики хромосомных аномалий и вариантов, включающий методы сканирования генома (цитогенетический анализ, HR-CGH и серийную CGH), исследование хромосом на клеточном уровне (MFISH, ICS-MCB, QFISH) и биоинформатический анализ, может с успехом использоваться в медико-генетической диагностической практике.

Молекулярно-цитогенетические исследования соматических геномных вариаций в эмбриональных тканях

Анализ с помощью методов MFISH/QFISH, PRINS и ICS-MCB (рис.1) более 420000 клеток эмбрионального мозга и 85000 клеток ворсин хориона (по ~5000 ядер при анализе каждого образца эмбрионального мозга и по ~1000 ядер — каждого образца ворсин хориона), суммированный в таблице 1, показал, что общее число анеуплоидных клеток в эмбриональном мозге составляет 30%.

Таблица 1. Сравнение частот спорадической анеуплоидии в клетках мозга и ворсин хориона.

Ткань	Количество клеток	Нормальные (диплоидные) клетки	Моносомия	Трисомия	Моносомия + трисомия	Полипloidия
Мозг	424674	418356 (98.5%)	4361 (1.03%)	1774 (0.42%)	6135 (1.45%)	183 (0.04%)
Ворсины хориона	85123	84241 (98.97%)	438 (0.51%)	392 (0.46%)	830 (0.97%)	52 (0.06%)
P			P<0.001	P=0.08	P<0.001	P=0.026

В эмбриональном мозге средний количественный индекс нестабильности хромосом (числовой показатель /процент/ нестабильности в расчете на каждую пару гомологов) был определен как 1,25, а в тканях хориона и эмбриональной кожи — 0,98 и 0,82 (частота анеуплоидии — 24% и 19%, соответственно). На основе анализа около 600000 клеток было показано, что эмбриональный мозг человека демонстрирует характерные соматические вариации генома в виде повышенного уровня стохастической анеуплоидии.

В четырех образцах эмбрионального мозга был обнаружен низкопроцентный хромосомный мозаицизм, который не наблюдался в ворсинах хориона, и был представлен случаями (i) дополнительной хромосомы X (2,8% — эмбриональный мозг, 1,2% — ворсины хориона; $p=0,004$) и хромосомы Y (5,9% — эмбриональный мозг, 1,8% — ворсины хориона; $p < 0,001$), (ii) моносомии хромосомы X (5,4% — эмбриональный мозг, 1,1% — ворсины хориона; $p < 0,001$), (iii) моносомии хромосомы 15 (6,2% — эмбриональный мозг, 1,2% — ворсины хориона; $p < 0,001$) и (iv)

моносомии хромосомы 18 (6,5% — эмбриональный мозг, 3,2% — ворсины хориона; $p < 0,001$).

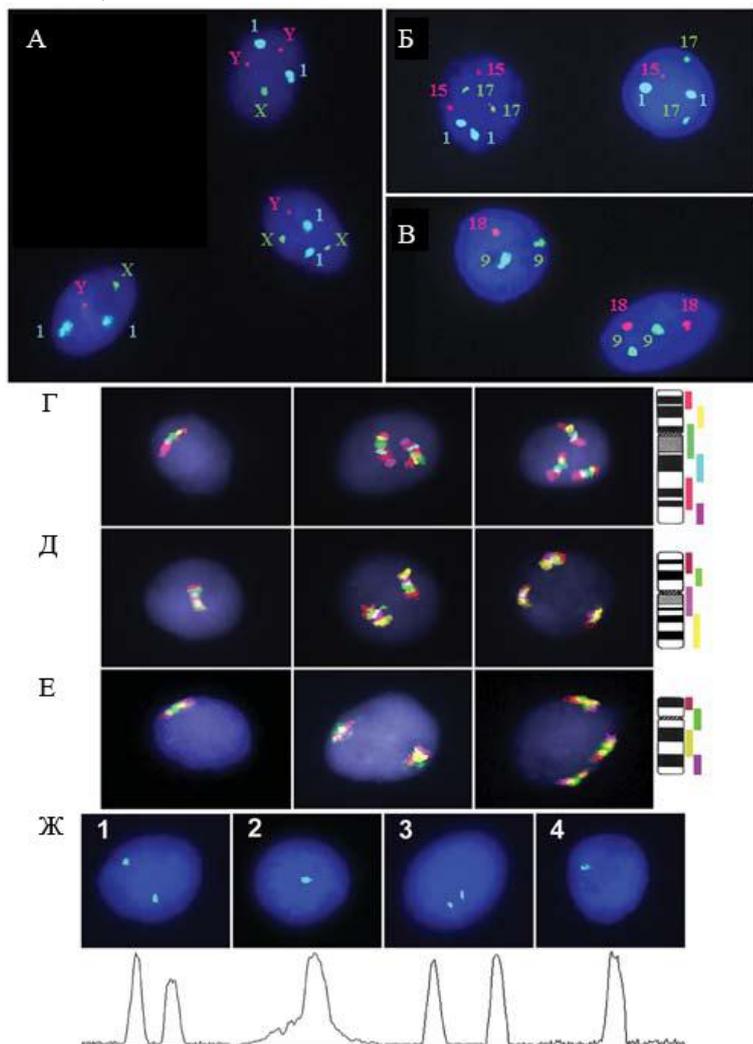


Рис.1. Анализ клеток эмбрионального мозга. (А-В) Интерфазная MFISH с центромерными пробами: (А) два ядра с дополнительными хромосомами Y и хромосомой X (пол плода мужской) и диплоидное ядро; (Б) ядро с моносомией хромосомы 15 и диплоидное ядро; (В) ядро с моносомией хромосомы 18 и диплоидное ядро; (Г-Е) ICS-MCB с пробами на хромосомы 9, 16 и 18, соответственно; слева направо примеры моносомии, дисомии и трисомии, соответственно, и идеограммы, показывающие схему мечения проб; (Ж) QFISH: (1) ядро с 2-мя сигналами на хромосому 18 и (2) ядро с ассоциированными сигналами на хромосому 18 (интенсивность соответствует 2-м сигналам); (3) ядро с 2-мя сигналами на хромосому 15 и (4) моносомия хромосомы 15 (интенсивность соответствует одному сигналу).

Отклонения частоты анеуплоидии были обнаружены исключительно в эмбриональном мозге методами MFISH/QFISH, PRINS, PNA и ICS-MCB и не выявлялись в клетках хориона и эмбриональной кожи этих плодов. Принимая во внимание наличие мозаичной хромосомоспецифичной анеуплоидии исключительно в тканях эмбрионального мозга, общее число анеуплоидных клеток должно составлять примерно 35%. В результате был сделан вывод о том, что эмбриональный мозг человека является, по-видимому, единственной неэкстраэмбриональной тканью, в которой выявлен тканеспецифический низкопроцентный хромосомный мозаицизм.

Поскольку идентификация возможных механизмов возникновения геномной (хромосомной) нестабильности в виде мозаичной анеуплоидии может быть проведена с помощью изучения органотипических культур клеток эмбрионального мозга (Suzuki et al., 2004), были дополнительно исследованы 6 образцов эмбрионального продолговатого мозга и 6 образцов органотипической культуры эмбрионального мозга. Было обнаружено, что частота мозаичной анеуплоидии увеличивается в 2-5 раз после органотипического культивирования без изменения соотношения пропорций моносомных и трисомных клеток. Это согласуется с представлениями о том, что митотическое нерасхождение хромосом, связанное с меротелической ориентацией

кинетохор лежит в основе образования геномной (хромосомной) нестабильности и анеуплоидизации в эмбриональном мозге человека (Ворсанова и др., 2006; Salmon et al., 2005).

Таким образом, мозг человека на ранних стадиях онтогенеза представляет собой эмбриональную ткань, в которой выявляются повышенный уровень спонтанных хромосомных мутаций и тканеспецифический хромосомный мозаицизм. Этот тип соматических вариаций генома можно рассматривать в качестве вероятной причины изменений в ходе внутриутробного развития плода, в целом, и эмбрионального мозга, в частности. По-видимому, он также может приводить к спонтанным абортam или заболеваниям головного мозга после рождения. Следовательно, чтобы оценить его эффект на внутриутробное развитие человека, необходимы исследования вариаций генома в материалах спонтанных абортусов.

Исследование методом MFISH с использованием материала 715 спонтанных абортусов позволило обнаружить хромосомные аномалии в 360 образцах (50,3%), из которых 184 образца (51,1% из всех аномалий и 25,7% из общего числа исследованных образцов) демонстрировали хромосомный мозаицизм. Частота хромосомного мозаицизма в материалах спонтанных абортусов, которая составляет примерно 25%, определена впервые. Более детальному исследованию подверглись 50 образцов без хромосомных аномалий (частота анеуплоидных клеток менее 5%) и 50 образцов с анеуплоидией аутосом и гоносом. Нестабильность была обнаружена во всех образцах и в среднем наблюдалась в 21% клеток (пересчет на весь хромосомный набор); ее индекс составил 1,67. Таким образом, показано, что спонтанные аборты имеют повышенный спорадический уровень хромосомной нестабильности. Следовательно, низкопроцентная мозаичная анеуплоидия, по-видимому, не является причиной спонтанных абортov и, таким образом, при условии пролиферации анеуплоидных клеток может быть связана с нарушениями функционирования головного мозга после рождения.

Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования детей с умственной отсталостью и/или ВПР

Цитогенетический анализ детей с умственной отсталостью и/или ВПР в сочетании с применением молекулярно-цитогенетических методов позволил выявить хромосомные аномалии в 212 случаях (13,1%) из 1781. Использование методов молекулярно-цитогенетической диагностики (MFISH, MCB или CGH) было признано необходимым для уточнения уровня мозаицизма и CIN, а также подтверждения/определения структурных перестроек и происхождения маркерных хромосом в 74% случаев (157 из 212) хромосомной патологии (9,7% среди всех исследованных детей). Хромосомный мозаицизм, представленный, в основном, случаями анеуплоидии был обнаружен в 61 случае (28,8% среди случаев хромосомной патологии) и составлял 3,8% среди всех исследованных детей. Среди детей с численными хромосомными аномалиями частота мозаичных случаев составила 54% (54 из 100). Мозаичные структурные аномалии наблюдались в двух случаях перестроек аутосом, во всех случаях изохромосом и двух случаях кольцевых хромосом. Среди детей с маркерными хромосомами мозаицизм был выявлен в 39% (9 из 23) случаев. Хромосомная нестабильность наблюдалась в 32 случаях (15,1% среди случаев хромосомной патологии; 1,9% среди всех исследованных детей), в одном из которых выявлено сочетание мозаицизма и CIN. В совокупности, частота мозаицизма

и CIN составила 43,4% среди случаев хромосомных аномалий, а среди всех исследованных детей — 5,7%.

При дополнительном молекулярно-генетическом исследовании регулярных форм анеуплоидии (синдром Дауна) было обнаружено, что вклад соматических вариаций генома в этиологию этих заболеваний значительно ниже. Это можно объяснить тем, что соответствующая клиническая картина наблюдается только в случаях, при которых большинство клеток имеют аномальный кариотип.

Суммируя полученные данные, сделано заключение о том, что мозаичные хромосомные аномалии, включая хромосомную нестабильность, имеют высокую частоту среди детей с умственной отсталостью и/или ВПР. Более того, гипотеза о том, что аномальные клетки, которые образуются за счет митотической нестабильности во время внутриутробного развития, в определенном числе случаев не подвергаются элиминации, и приводят к нарушениям жизнедеятельности организма, в целом, и головного мозга, в частности, а также, по-видимому, она верна по отношению к не менее чем 5% случаев умственной отсталости. Таким образом, молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомного мозаицизма и нестабильности является необходимой при медико-генетическом консультировании случаев умственной отсталости.

Проведены исследования с использованием методов высокоразрешающего сканирования генома (HR-CGH и серийной CGH). Метод HR-CGH позволил обнаружить несбалансированные структурные хромосомные перестройки (делеции, дупликации и анеуплоидию хромосомы X) в 46 случаях (46%) из 100 (рис.2).

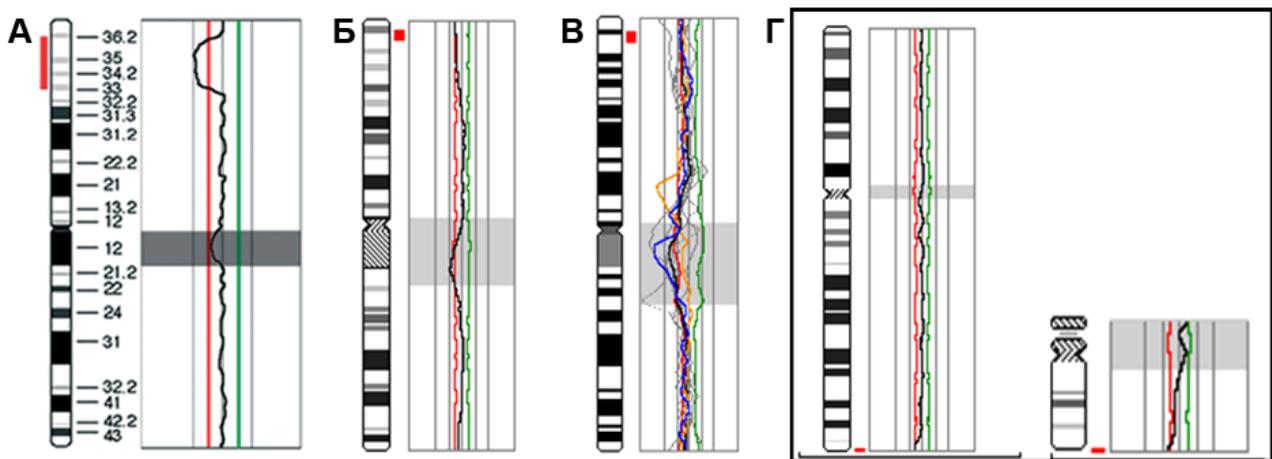


Рис.2. Примеры результатов анализа методом HR-CGH: (А) ish cgh del(1)(p36.2p33); (Б) ish cgh del(1)(p36.21p36.13); (В) ish cgh del(1)(p36.3p36.1); (Г) ish cgh del(2)(q37.3qter), del(22)(q13.33qter);

Делеции были обнаружены в 29 случаях (63%), дупликации — в 7 случаях (15%), сочетанные делеции/дупликации — в 7 случаях (15%). Субтеломерные перестройки (делеции и делеции/дупликации) были выявлены в 19 случаев (41%). Размер структурных перестроек варьировал в пределах от 2-2,5 до 40 млн. пн. Примечательно, что HR-CGH позволила также выявить и микроперестройки, связанные с так называемыми «новыми микроделеционными синдромами» (2 случая — делеции 19q13.11, по одному случаю — делеции 2q23.1, 15q13, 15q24, 16p11.2-p12.2 и 17q21.31). Особо следует отметить микроделецию, обнаруженную у ребенка с синдромом Аспергера, поскольку ранее при этом заболевании геномных перестроек не описано. Учитывая, что подобные формы хромосомной патологии выявляются практически только с помощью серийной CGH (Stankiewicz, Lupski, 2010), можно

сделать заключение о том, что предлагаемый протокол HR-CGH является эффективным для диагностики субмикроскопических геномных микроперестроек (эффективность более 40%) и может быть использован для поиска генетических причин нервно-психических заболеваний.

В ряде случаев (n=14) было проведено исследование с использованием серийной CGH (рис.3). Показано что, эта технология является эффективной для диагностики регулярных хромосомных аномалий и описания вариаций генома, связанных с нервно-психическими заболеваниями. Более того, в ряде случаев (например, синдром Паллистера-Киллиана) она может быть использована для идентификации мозаицизма. Выявление субмикроскопических микроперестроек ставит вопрос об интерпретации их патогенетического значения, как в диагностических целях, так и для определения патологических процессов, связанных с нервно-психическими заболеваниями и геномными вариациями.

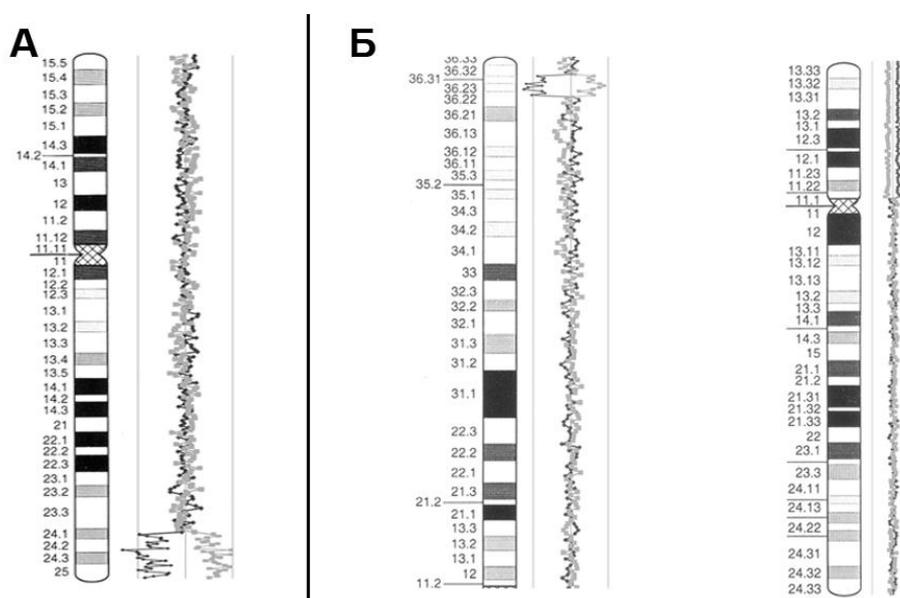


Рис.3. Примеры исследования хромосомных перестроек с помощью серийной CGH. (А) Кольцевая хромосома 11: делеция 11q24.1->11qter от 121411392-ого нуклеотида хромосомы 11 до терминального (теломерного) участка (~13,5 млн. пн); (Б) Делеция 1p36.32->1p36.22, составляющая примерно 4,44 млн. пн нуклеотидов, от 4932799-ого до 9373344-ого нуклеотида хромосомы 1, и увеличение на 20-30% количества ДНК всего короткого плеча хромосомы 12 (примерно 33,5 млн. пн).

Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования детей с аутизмом и их матерей

Исследовано 160 детей с недифференцированным аутизмом. В 116 образцах лимфоцитов периферической крови детей с аутизмом была исследована мозаичная анеуплоидия (контроль: образцы 60 детей без нарушения психики), в 109 — хромосомный гетероморфизм и аномалии (некоторые случаи исследовались дополнительно методами MFISH и HR-CGH), а также был проведен анализ 98-ми пар «ребенок-мать» для выявления возможных ассоциаций хромосомных аномалий, гетероморфизма или нестабильности с нервно-психическими нарушениями. Были обнаружены следующие хромосомные аномалии: 46,XY,t(1;6)(q42.1;q27); 46,XY,inv(2)(p11q13); 46,XY,der(6),ins(6;1)(q21;p13.3p22.1)pat; 46,XY,r(22)(p11q13) и mos47,XXX[98]/46,XX[2]. Таким образом, частота хромосомных аномалий,

выявленная с помощью цитогенетического анализа, составила 5,5%. Изменения размеров гетерохроматиновых районов хромосом в виде экстремального увеличения/уменьшения (по данным QFISH), а также инверсии были выявлены у 52 детей с аутизмом (47,7%), среди которых 1p_hq_h — у 7% детей; 9p_hq_h — у 8%; 9q_h+ — у 3%; 9q_h- — у 1%; 16q_h+ — у 1%; 16q_h- — у 3%; другие хромосомные варианты у 5,7%. Сочетанные варианты наблюдались в 19% случаев. В контрольной группе хромосомные варианты наблюдались в 5,3% случаев и их частота достоверно отличалась от обнаруженной среди детей с аутизмом ($P < 0,05$). Исходя из полученных данных по изучению детей, можно говорить о том, что вариации околоцентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16 наблюдаются достоверно чаще при аутистических расстройствах по сравнению с контрольной группой и, следовательно, являются характерными для аутизма. При анализе косегрегации цитогенетических маркеров и нервно-психических нарушений в семьях детей с аутизмом было показано, что в 56% случаев мозаичные хромосомные аномалии и нестабильность наследовались от матерей. Косегрегация хромосомного гетероморфизма и нарушения психики была обнаружена в 70% случаев. Обнаружено увеличение частоты когнитивных нарушений и спонтанных аборт у матерей детей с аутизмом, имеющих хромосомные аномалии, а также повышенная частота умственной отсталости, смерти в раннем возрасте и нарушений репродуктивной функции в родословных этих женщин. Суммируя полученные данные, можно сделать заключение о том, что определение геномных изменений у больных детей и их матерей значимо для идентификации генетических и нейробиологических маркеров аутистических расстройств.

Молекулярно-цитогенетические исследования 120 детей с идиопатическим аутизмом и в контрольной группе из 60 детей с помощью анализа более 420000 клеток методом MFISH (рис.4) позволили обнаружить у 19 детей с аутизмом повышенную частоту анеуплоидии аутосом (8 случаев — трисомия хромосом 9, 15 и моносомия хромосом 15, 16 и 18) и хромосомы X (11 случаев дополнительной хромосомы X) среди 116 мальчиков с идиопатическим аутизмом (16,4%). Дополнительная хромосома 9 представляла собой $der(9)(pter \rightarrow 9q32:)$, а низкопроцентная трисомия хромосомы 15 представляла собой наличие дополнительной хромосомы $der(15)$ (рис.4). Случаи мозаицизма XXY/XY, выявленные у 10% детей, были связаны с дополнительной хромосомой X без структурных перестроек.

Мозаичная анеуплоидия у детей с аутизмом описывается впервые. Ее частота составляет 16% (19 из 116), позволяя рассматривать этот тип соматических геномных вариаций в качестве самой распространенной генетической аномалии при данном гетерогенном генетическом заболевании.

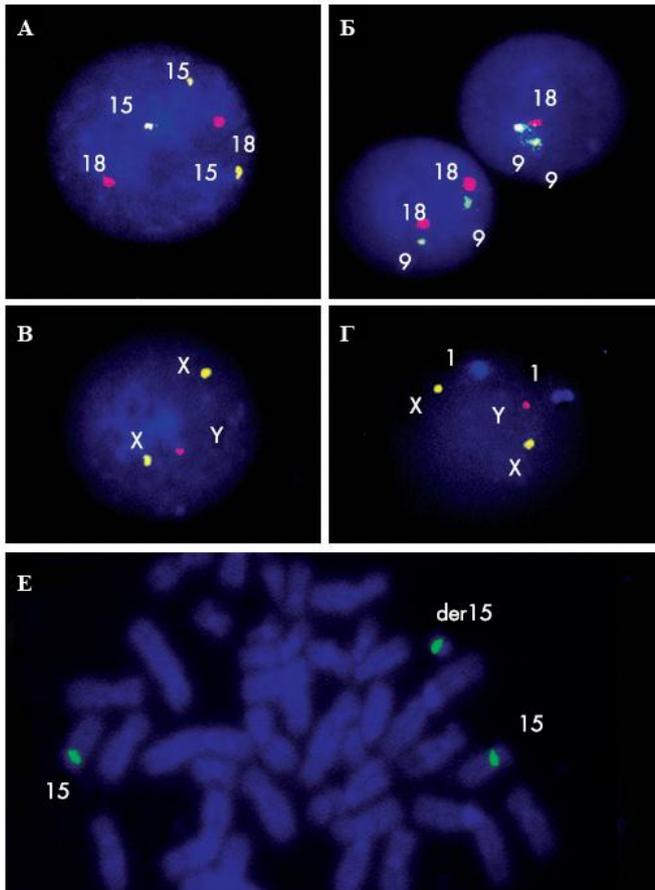


Рис.4. MFISH с центроммерными ДНК пробами на клетках лимфоцитов детей с аутизмом. (А) Трисомия хромосомы 15 в интерфазном ядре (три сигнала); (Б) мозаичная моносомия хромосомы 18; (В) и (Г) дисомия хромосомы X при мужском кариотипе; (Е) метафазная пластинка с дополнительной дериватной хромосомой 15.

Анализ функциональных последствий, причин возникновения и интерпретации хромосомных аномалий

В работе предложено оценить эффект анеуплоидии на транскрипционную активность хромосомы X с помощью исследования особенностей X-инактивации в клетках девочек с дополнительной хромосомой 21 (синдром Дауна) и их матерей. В случаях структурных геномных перестроек было предложено использовать оригинальный биоинформатический метод с последующим интерактивным и реактивным анализом. В ряде случаев CIN и мозаицизма также были проведены дополнительные исследования. Впоследствии, было обнаружено, что данный подход к оценке последствий структурных перестроек может быть с успехом использован для картирования генов-кандидатов и идентификации «процессов-мишеней», связанных с патогенезом заболеваний аутистического спектра. Биоинформатический анализ также был использован для изучения участков генома, фланкирующих точки разрыва структурных перестроек. В результате этого исследования были предложены возможные механизмы возникновения структурных хромосомных аномалий и геномных перестроек.

Сравнение данных об особенностях инактивации хромосомы X в исследованных группах показали, что частота неравной X-инактивации статистически достоверно увеличена среди детей с трисомией хромосомы 21 ($P < 0,001$). В группе матерей повышенная частота случаев неравной инактивации хромосомы X не обнаружена ($P > 0,05$). Таким образом, наличие анеуплоидии может проявлять эффект не только на транскрипцию генов хромосомы, вовлеченной в численную хромосомную аномалию, но также и влиять на процесс транскрипционной регуляции генов хромосомы X.

Случаи, отобранные для дополнительных исследований, были связаны с анеуплоидизацией аутосом и хромосомы X, и демонстрировали средние уровни хромосомной нестабильности, сравнимые с эмбриональными тканями. Следовательно, можно с высокой долей вероятности предположить, что нарушения функционирования головного мозга в исследованных случаях являются результатом соматических вариаций генома, проявляющихся в виде анеуплоидии. Однако, проблемы, возникающие при выявлении данных форм хромосомных аномалий, связаны не только с необходимостью корректной интерпретации данных, но также и со сложностями идентификации «доверительных интервалов» (количества аномальных клеток) для того, чтобы было возможно выявлять «истинный» хромосомный мозаицизм в отдельно взятой популяции клеток. В настоящей работе было исследовано около 5 млн. клеток девятью сериями с использованием разных систем оценки мозаицизма: подсчет 100, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000 и 10000 клеток. Суммируя данные по идентификации хромосомного мозаицизма, было обнаружено, что оптимальное количество клеток для соответствующего анализа составляет от 3000 до 5000. При анализе большего числа клеток отклонений уровней мозаицизма практически не наблюдается. Распределение результатов по каждой методике позволило предложить соответствующие рекомендации (табл.2).

Таблица 2. Рекомендации для определения СГВ, хромосомного мозаицизма и CIN с помощью МЦГ методов, основанные на полученных данных (анализ ~5 млн. клеток).

МЦГ методы	Феномены, выявляемые с помощью данного метода и системы оценки мозаицизма	Эффективность*	Количество анализируемых клеток
MFISH	Хромосомный мозаицизм и CIN	~5%	300-500
ICS-MCB	Хромосомный мозаицизм, CIN, другие формы СГВ и псевдомозаицизм (при выявлении одной клетки с аномалией)	0,1-1%	100-1000
MFISH/QFISH	Хромосомный мозаицизм и CIN	0,1-0,5%	3000-5000
MFISH/QFISH/ICS-MCB	Хромосомный мозаицизм, CIN и другие формы СГВ	<0,1%	3000-5000

Примечание: * — эффективность соответствует проценту аномальных клеток, выявляемых с помощью соответствующих методов и системы оценки мозаицизма.

С помощью оригинального биоинформатического метода было проведено исследование случаев структурных геномных перестроек, обнаруженных с помощью методов HR-CGH и серийной CGH. Было показано, что предложенный биоинформатический метод может быть с успехом использован для интерпретации результатов высокоразрешающего сканирования генома методами HR-CGH и серийной CGH. Он также эффективен для оценки эффекта CNVs на фенотипические проявления при умственной отсталости и ВПР. Более того, этот алгоритм может быть с успехом использован для поиска генов-кандидатов различных нервно-психических заболеваний. В связи с этим, было рекомендовано провести соответствующий анализ для детей с аутизмом, у которых были обнаружены геномные перестройки.

Использование метода *in silico* позволило определить несколько генов-кандидатов у детей с аутизмом, для которых был также проведен интерактомный и реактомный анализ геномных/протеомных сетей: *SCARB2*, *TPPP*, *PDCD6*, *NPTX1*, *STCH*, *NRIP1*, *CXADR*, *SEPT5*, *GP1BB* и *PI4KA* при аутизме и *ССК* — при синдроме Аспергера. Геномные перестройки при аутистических расстройствах приводят к потере генов, интерактомный/реактомный анализ которых указывает на изменения в таких процессах, как регуляция клеточного цикла (митоза и сегрегации хромосом) и запрограммированная клеточная гибель. В аспекте данных о высокой частоте хромосомного мозаицизма среди детей с аутизмом и в тканях эмбрионального мозга этот факт позволяет сделать вывод о том, что существует связь между этими феноменами. *In silico* анализ делеций и дупликаций также показал, что взаимодействие генных кластеров гомологичных и негомологичных хромосом может рассматриваться в качестве наиболее вероятного процесса, за счет которого образуются структурные геномные перестройки.

Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга в норме

Методами MFISH, QFISH, ICS-MCB и иммуно-FISH были проанализированы 12 образцов коры головного мозга (поле Бродманна 10) индивидуумов в возрасте от 24 до 60 лет. В ходе исследования 288000 клеток постмортального головного мозга нормальных индивидуумов было обнаружено, что число анеуплоидных клеток в случае аутосом варьирует в пределах 0,2-0,6%, а хромосомы X — 2% (табл.3).

Таблица 3. Частота анеуплоидных клеток (средняя) в образцах постмортального мозга по данным MFISH/QFISH и ICS-MCB с ДНК пробами на хромосомы 1, 9, 16, 18 и X.

Хромосомы	MFISH/QFISH n=216000	ICS-MCB n=72000	Общее количество анеуплоидных клеток (моносомия и трисомия)
1	0,3%	0,3%	863
9	0,6%	0,5%	1585
16	0,2%	0,4%	839
18	0,3%	0,2%	718
X	1,8%	2%	5471

Для анализа анеуплоидии в определенных типах клеток головного мозга в норме была использована иммуно-FISH. В результате исследования примерно 10000 ядер было показано, что частота анеуплоидии не демонстрирует статистически достоверного различия между популяциями нейронов и глиальных клеток ($P=0,03$), даже несмотря на то, что последних в 10-100 раз больше. Суммируя данные относительно соматических геномных вариаций в клетках голоного мозга человека в норме, можно заключить, что, несмотря на трехкратное снижение частоты анеуплоидных клеток в ходе онтогенеза, их число, тем не менее, является значительным, составляя примерно 10%.

Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при шизофрении

Сочетание методов MFISH/QFISH и ICS-MCB с ДНК пробами на хромосомы 1, 9, 15-18, X и Y (рис.5) позволило исследовать примерно 1 млн. клеток головного мозга больных шизофренией (n=18) и контрольных образцов (n=18). Средняя частота моносомии и трисомии хромосомы 1 составила 0,6% (0,3–0,9%; $M+3SD=3,5%$) и 0,5%

(0,2–0,8%; $M+3SD=2,7\%$), соответственно. В случаях мозаицизма моносомия наблюдалась в 3,6%, трисомия — в 4,7%. Анализ контрольных образцов ($n=18$) показал, что частота анеуплоидии хромосомы 1 составляет 0,6% (0,3% — моносомия/0,2–0,4%; 0,3% — трисомия/0,2–0,4%) (рис.5), $M+3SD$ — 0,7%. Случаев низкопроцентного мозаицизма при данном исследовании обнаружено не было. Средний уровень анеуплоидии хромосомы 1 в образцах головного мозга при шизофрении был оценен как 1,8% (0,9% — моносомия/0,3–1,5%; 0,9% — трисомия/0,2–1,7%). При определении среднего уровня анеуплоидии хромосомы 1 без учета двух случаев низкопроцентного мозаицизма он составил 1,1% (0,6% — моносомия/0,3–0,9%; 0,5% — трисомия/0,2–0,9%), $M+3SD$ — 0,7% и статистически достоверно отличался от контроля ($P=0,005$ и $P=0,001$ для моносомии и трисомии, соответственно).

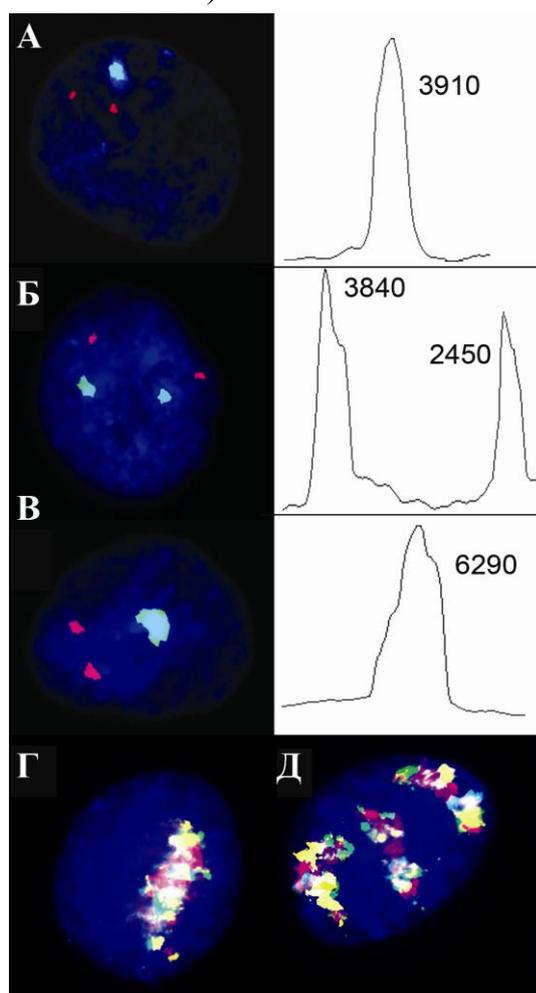


Рис.5. Анализ анеуплоидии клеток головного мозга больных шизофренией. Интерфазная MFISH/QFISH с центромерными ДНК пробами: (А) ядро с моносомией хромосомы 1 (один сигнал; относительная интенсивность 3910) и с дисомией хромосомы X; (Б) ядро с дисомией хромосомы 1 (два сигнала; относительная интенсивность 3840 и 2450) и дисомией хромосомы X; (В) ядро с дисомией хромосомы 1 (один сигнал; относительная интенсивность 6290) и с дисомией хромосомы X. ICS-MCB при применении ДНК пробы на хромосому 1: (Г) моносомия и (Д) трисомия.

При анализе других хромосом было обнаружено три дополнительных случая низкопроцентного мозаицизма в клетках головного мозга при шизофрении. В одном была обнаружена моносомия хромосомы 18 в 3,2% клеток. Исследование контрольных образцов подобную аномалию выявило в 0,3% клеток. Увеличение уровней нестабильности в виде стохастической анеуплоидии хромосомы 18 в клетках головного мозга больных шизофренией также обнаружено не было: 0,4% — контрольные образцы (0,3% моносомия и 0,1% трисомия), 0,5% — образцы индивидуумов с шизофренией (0,3 моносомия и 0,2% трисомия) $M+3SD$ для шизофрении и контроля — 0,6% ($P<0,05$). Два других случая низкопроцентного мозаицизма представляли собой сочетанные аномалии: трисомия хромосомы 18 и

трисомия хромосомы X. В одном образце трисомия хромосомы X была выявлена в 4% клеток ($P < 0,001$), а трисомия хромосомы 18 — в 2,5% клеток ($P < 0,001$). Во втором — трисомия хромосомы X обнаружена в 3% клеток ($P < 0,001$), а трисомия хромосомы 18 — в 0,5% клеток ($P < 0,05$). Анализ других аутосом (хромосомы 9, 15, 16, 17) и хромосомы Y также не выявил повышенного уровня хромосомной нестабильности в виде стохастической анеуплоидии, который варьировал в пределах 0,2%-0,6% в контроле и 0,3%-0,7% — при шизофрении ($P < 0,05$ во всех случаях). Увеличение уровня нестабильности в виде стохастической анеуплоидии хромосомы X (моносомии и трисомии) было также не обнаружено: 1,2%-1,7% в контроле и 1,5%-1,9% — при шизофрении ($P < 0,05$ во всех случаях). В результате проведенного исследования 18 образцов головного мозга индивидуумов, страдающих шизофренией, и 18 контрольных образцов было показано, что при этом заболевании повышен уровень CIN, проявляющейся в виде мозаичной анеуплоидии хромосомы 1. Помимо этого, было показано, что 5 из 18 (около 30%) случаев шизофрении ассоциированы с низкопроцентной мозаичной анеуплоидией: трисомией хромосомы 1, моносомией хромосомы 1, моносомией хромосомы 18 и сочетанной трисомией хромосом 18 и X, обнаруженной в двух случаях. Учитывая полученные данные, можно сделать обоснованный вывод о том, что определенное число случаев шизофрении могут быть связаны с хромосомным мозаицизмом в клетках головного мозга. Повышенный уровень хромосомной нестабильности, вероятно, отражает результат нарушений ЦНС в ходе развития, которые описаны при шизофрении (Jarskog et al., 2005). Согласно литературным данным, гены хромосомы 1 участвуют в различных молекулярных и клеточных процессах, которые нарушены в клетках головного мозга при данном заболевании (Camargo et al., 2007). Следовательно, увеличение уровня хромосомной нестабильности и низкопроцентная мозаичная анеуплоидия в тканях ЦНС при шизофрении может рассматриваться, как вероятный элемент механизма возникновения этого гетерогенного заболевания.

Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при болезни Альцгеймера

Используя интерфазную MFISH/QFISH и ICS-MCB, было показано, что в клетках коры головного мозга при БА наблюдается повышенный уровень мозаичной анеуплоидии с вовлечением разных хромосом (рис.6). Анализ был проведен на более 250000 клеток контрольных образцов, и более 250000 клеток образцов тканей головного мозга индивидуумов с БА. Было обнаружено, что средняя частота анеуплоидии (моносомии и трисомии) значительно варьирует в зависимости как от исследуемой пары гомологичных хромосом, так и на межиндивидуальном уровне.

При исследовании хромосом 1, 7, 14 и X методом ICS-MCB средний процент анеуплоидии при БА был 1,4-2,6%. Различия между частотами анеуплоидии в клетках головного мозга при БА и в контроле были незначительными ($P > 0,05$). Процент анеуплоидии с вовлечением хромосомы 21 был в 6-15% клеток мозга при БА и 0,8-1,8% — в контроле. Среднее значение анеуплоидии с вовлечением хромосомы 21 в мозге при БА было определено как 10,7% (6,5-14,7%) и 1,7% (1,4-2,7%) — в контроле. Различия между образцами БА и в контроле было статистически значимым ($P < 0,001$).

Анализ проводился также методом immuno-FISH с целью определения анеуплоидии в NeuN-позитивных (нейроны) и NeuN-негативных («нейрональные» клетки) клетках головного мозга контроля и БА. Различия между уровнем анеуплоидии в NeuN-позитивных и NeuN-негативных клетках, а также в норме и при

БА было статистически недостоверным ($P > 0,05$). В связи с этим было сделано заключение о том, что все типы клеток в равной степени подвержены процессу анеуплоидизации.

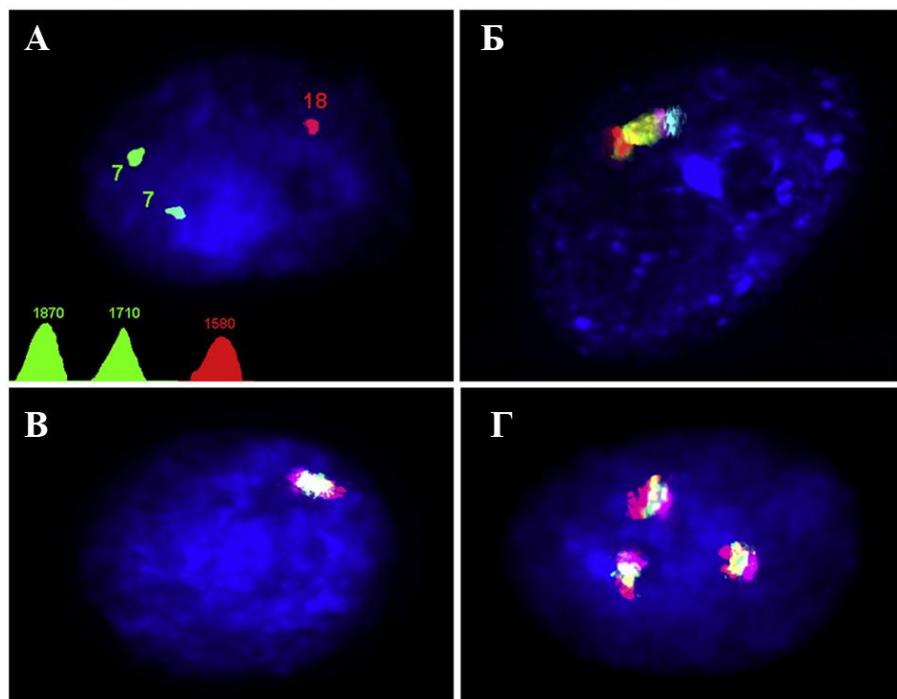


Рис.6. МЦГ исследование клеток головного мозга при БА. (А) Моносомия хромосомы 18, обнаруженная MFISH/QFISH; (Б) Моносомия хромосомы 14, определенная с помощью метода ICS-MCB; (В) Моносомия хромосомы 21, определенная с помощью метода ICS-MCB; (Г) Трисомия хромосомы 21, определенная с помощью метода ICS-MCB.

Поскольку при БА нейродегенерация поражает преимущественно кору и гиппокамп (Dillen K., Annaert, 2006; Swerdlow, 2007), был проведен сравнительный анализ вариаций хромосомного набора в клетках соответствующих областей головного мозга: кора (поле Бродманна 10), гиппокамп и мозжечок пяти индивидуумов с БА (всего 15 образцов). Исследование клеток, полученных из образцов мозжечка пациентов с БА и контрольной группы, показало, что анеуплоидия варьирует в пределах 0,7-3,7% (БА) и 0,3-1,7% (контроль). При сравнении было показано, что при БА наблюдается повышенный уровень CIN в виде мозаичной анеуплоидии ($P < 0,05$). Однако в мозжечке при БА не была обнаружена мозаичная анеуплоидия хромосомы 21. Анализ клеток гиппокампа показал, что в этой области головного мозга наблюдается наиболее высокий уровень нестабильности как по сравнению с мозжечком, так и корой. Был также обнаружен (как и в коре) высокий уровень анеуплоидии хромосомы 21 в гиппокампе, который варьировал в пределах от 15,3% до 29,1%. Исключив анеуплоидию хромосомы 21, анеуплоидия с участием других хромосом составила 3,1-10,2%, в контрольной группе — 0,7-2,3%. Примечательно, что один из образцов демонстрировал повышенный уровень анеуплоидии хромосомы X — примерно 10% (моносомия; пол пациента женский) в коре и гиппокампе, но не в клетках мозжечка.

В заключение, необходимо отметить, что в работе впервые представлены данные о том, что мозаичная анеуплоидия хромосомы 21 в клетках гиппокампа и коры головного мозга связана с нейродегенерацией при БА. Это меняет современные представления о патогенезе этого заболевания, демонстрируя, что соматическая геномная/хромосомная нестабильность, которая преимущественно ассоциирована с малигнизацией, может быть причиной нарушения функционирования головного мозга. Однако, для подтверждения связи между CIN и нейродегенерацией необходимы дополнительные исследования клеток головного мозга при других

заболеваниях, ассоциированных с дегенерацией нервных клеток. Наиболее адекватной моделью нейродегенерации специфических областей головного мозга является АТ, которая также является синдромом CIN (McKinnon, 2004; Yang, Herrup, 2005; Ziv et al., 2005; Lavin, 2008). Следовательно, изучение областей головного мозга, в которых наблюдается дегенерация нервных клеток, при АТ необходимо для дополнительных доказательств связи CIN с нейродегенерацией.

Молекулярно-цитогенетические исследования клеток головного мозга при атаксии-телеангиэктазии (синдром Луи-Бар)

В работе впервые проведен анализ CIN и селективной гибели нервных клеток в пораженном нейродегенерацией мозжечке. Для этого была определена частота анеуплоидии и хромосомных разрывов в клетках коры и мозжечка постмортальных образцов головного мозга в норме и при АТ МЦГ методами, а именно, интерфазной MFISH и ICS-MCB. При синдроме АТ молекулярно-цитогенетическое исследование показало уровень анеуплоидии в пределах от 1,3 до 5,6% для аутосом и хромосомы Y. Анеуплоидия хромосомы X была обнаружена в 1,6-3,7% клеток. Таким образом, общее число анеуплоидных клеток, обнаруженное в образцах мозжечка индивидуумов с АТ, составило 5908 из 35000 (16,9%), а в контроле — 1176 из 35000 (3,4%). Сравнение уровня анеуплоидии при АТ и в контроле показало, что они достоверно отличаются ($p < 0,0001$). Следует отметить, что в случае аутосом в 2-3 раза чаще наблюдалась моносомия по сравнению с трисомией. Полиплоидия и полисомия была обнаружена в очень небольшом числе клеток (21 клетка из 35000) при АТ и практически не наблюдалась в контроле (8 клеток из 35000). Анализ образцов мозжечка у индивидуумов с АТ и в контрольной группе с использованием ICS-MCB подтвердил данные MFISH/QFISH по количеству анеуплоидных клеток в контрольной группе. Однако, в тканях мозжечка, помимо анеуплоидии, были обнаружены также клетки с перестроенными хромосомами 7, 14, X. Аномалии хромосом 7 и X в 0,8-7,3% клеток были представлены, в основном, разрывами в участках локализации афидиколиновых ломких сайтов FRA7C, FRAXB и FRAXC, подтверждая наблюдения о том, что мутации гена *ATM* приводят к нестабильности частых сайтов ломкости хромосом (Ozeri-Galai et al., 2008). Наиболее распространенной формой хромосомных перестроек в клетках мозжечка пациентов с АТ являлась дериватная (во многих клетках дополнительная) хромосома 14. ICS-MCB анализ показал, что ее структура соответствует *der(14)del(14)(q12)*. В большинстве клеток перестроенная хромосома присутствовала вместо одной нормальной хромосомы 14 или являлась дополнительной при диплоидном наборе хромосом. Тем не менее, в небольшом числе клеток выявлялись 2-6 дополнительных перестроенных хромосом 14. Частота клеток с перестроенными хромосомами 14 составляла от 1,2 до 47%. С использованием оригинального биоинформатического метода для анализа хромосомного участка 14q12 и определения экспрессии генов, расположенных в нем, удалось картировать наиболее вероятные точки хромосомных разрывов, которые соответствовали локусами генов *NOVA1* и *FOXG1B* (рис.7). Сравнение частоты анеуплоидии и хромосомных перестроек (разрывов), выявленных с помощью ICS-MCB показало, что в клетках мозжечка при АТ наблюдается в значительной степени повышенный уровень нестабильности хромосом. Следовательно, можно заключить, что при этом заболевании селективная дегенерация мозжечка связана с нестабильностью генома в виде анеуплоидии и хромосомных перестроек (разрывов).

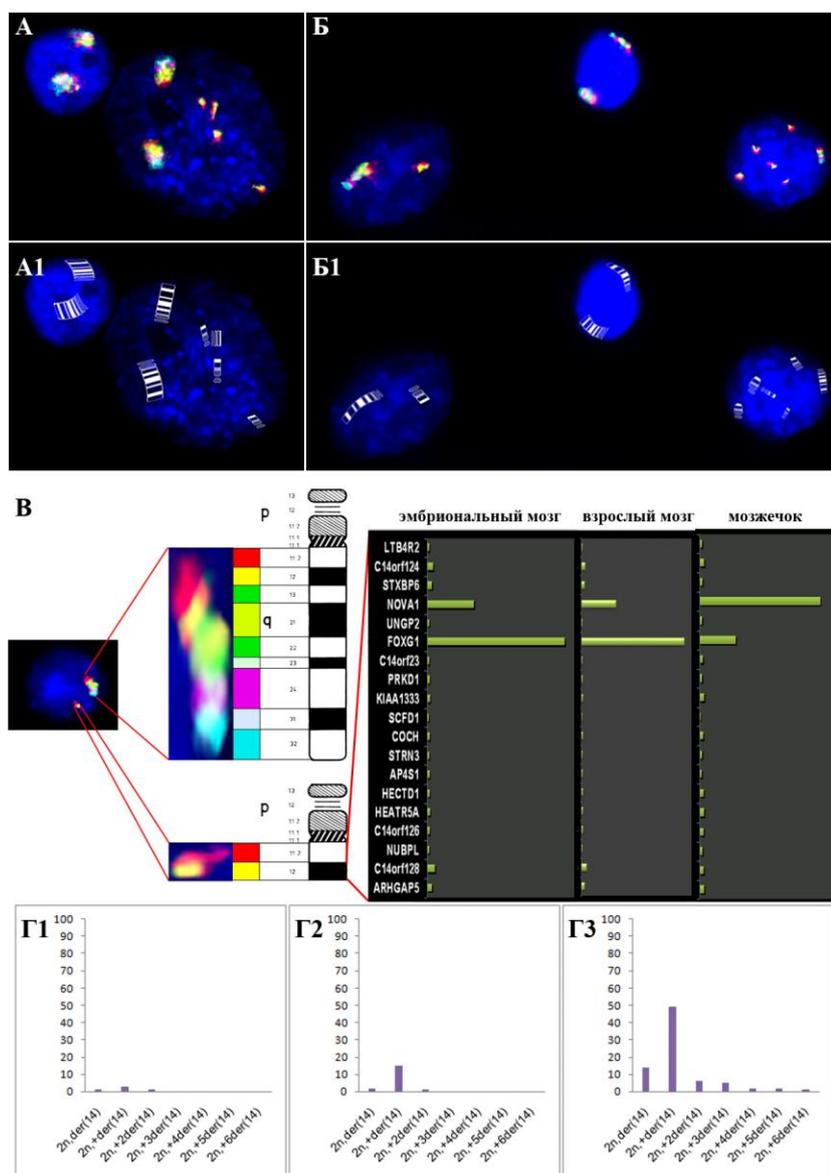


Рис.7. Анализ разрывов хромосомы 14 в клетках мозжечка при АТ. (А) Методом ICS-MCB показано наличие четырех дополнительных перестроенных хромосом 14 — *der(14)del(14)(q12)*; (А1) Схематическое изображение перестройки (идеограмма) показано на А; (Б) Методом ICS-MCB показано наличие клетки с потерей хромосомы 14 и *der(14)*, а также клетки, в которой при потере хромосомы 14 наблюдается пять перестроенных хромосом 14; (Б1) Схематическое изображение перестройки (идеограмма) показано на Б; (В) Картирование точек разрыва в участке 14q12 с помощью ICS-MCB и биоинформатического метода, демонстрирующее, что наиболее вероятными геномными локусами разрывов являются гены *NOVA1* и *FOXG1B*; (Г1-Г3) Частота клеток с различным количеством перестроенных хромосом 14 в трех образцах.

Образцы мозжечка при АТ были также исследованы с помощью метода иммуно-FISH с целью определения типа клеток, наиболее подверженных CIN и анеуплоидизации. Использование трехцветной FISH в сочетании с иммунотипированием нейронов при помощи антител NeuN показало, что анеуплоидия преимущественно наблюдается в NeuN-негативных клетках (20% — NeuN-позитивные клетки, 80% — NeuN-негативные) (рис.8). Следовательно, можно предположить, что CIN при АТ преимущественно наблюдается в «нейрональных» клетках в отличие от шизофрении и БА. Данное наблюдение также отчасти объясняет увеличение уровней нестабильности генома в зависимости от возраста пациентов.

В настоящее время имеются данные молекулярно-биологических и биохимических исследований, которые могут объяснить наличие повышенного уровня анеуплоидии в клетках мозжечка больных с АТ. С одной стороны показано, что в ходе пренатального развития наблюдается повышенная экспрессия гена *ATM*.

Предполагается, что это связано с его значением в поддержании стабильности генома в ходе нейрогенеза (Allen et al., 2001; McKinnon, 2004).

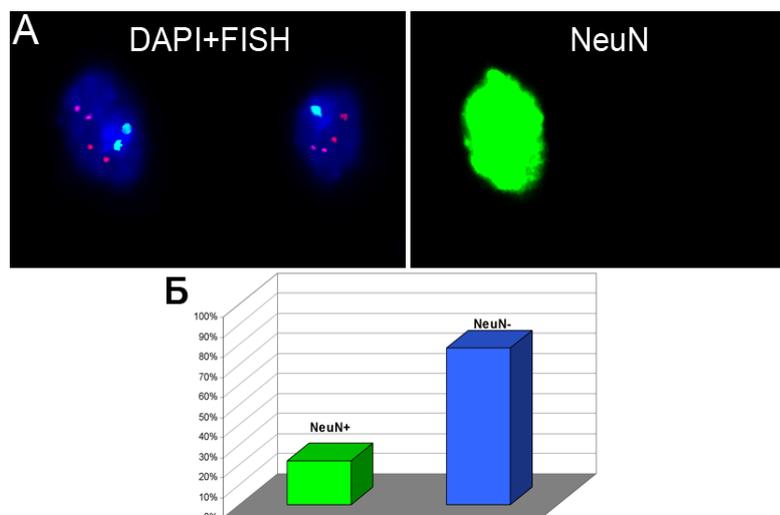


Рис.8. Многоцветная иммуно-FISH (NeuN+FISH) на клетках мозжечка при АТ. (А) трехцветная MFISH (хромосома 1 — голубые сигналы, хромосома 18 — розовые сигналы, хромосома X — красные сигналы), окрашивание ядер DAPI и иммуногистохимической реакцией с антителом NeuN; в NeuN-негативном ядре — моносомия хромосомы 1; (Б) Частота NeuN-позитивных (~20%) и NeuN-негативных (~80%) ядер в мозжечке пациентов с АТ.

Более того, показано, что наиболее высокая активность этого гена в ходе внутриутробного развития наблюдается непосредственно в клетках мозжечка (Ока, Tashima, 1998). С другой стороны, в нормальном эмбриональном мозге уровень анеуплоидии наблюдается примерно в 30-35% клеток и снижается до 10% во взрослом мозге. Этот факт свидетельствует, по-видимому, о том, что ген *ATM* является в определенной степени «протектором» против анеуплоидизации нервных клеток, способствуя селективной элиминации аномальных клеток в процессе эмбрионального и постнатального нейрогенеза (Allen et al., 2001; Shiloh, 2003; McConnell et al., 2004; McKinnon, 2004). Можно предположить, что нарушение функций белка ATM приводят к увеличению числа анеуплоидных клеток в мозжечке при данном заболевании. Это также подтверждается исследованием изменения экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла, взаимодействующих с белком ATM в клетках головного мозга (Yang, Herrup, 2005). Таким образом, учитывая современные представления о молекулярных и клеточных механизмах развития ЦНС и данные, полученные в настоящей работе при молекулярно-цитогенетическом анализе клеток головного мозга при БА и АТ, обосновано заключение о том, что CIN и анеуплоидизация с участием определенных хромосом в специфических отделах головного мозга является одним из механизмов нейродегенерации.

Анализ функциональной организации интерфазных хромосом в клетках головного мозга в норме и при нервно-психических заболеваниях

До настоящего времени функциональная (ядерная) организация хромосом в клетках головного мозга человека не исследовалась. В данной работе было проведено исследование методами MFISH/QFISH и ICS-MCB с использованием ДНК проб на хромосомы 1, 9, 16, 18, 19 и X примерно 300000 клеток головного мозга. Помимо индивидуумов без нервно-психической патологии организация хромосом в интерфазных клетках головного мозга исследовалась при шизофрении и БА (200000 клеток).

Результаты анализа организации хромосом в интерфазных клетках головного мозга показали, что хромосомы занимают определенную территорию, которая, тем не менее, не является строго заданной. Иными словами, в отличие от неоднократно исследованных митотических клеток (Croft et al., 1999; Leitch, 2000; Jackson, 2003; Gilbert et al., 2005; Finch et al., 2008; Cremer, Cremer, 2010) расположение хромосом в интерфазных ядрах клеток ЦНС в значительной степени варьировало. Более того, размер территории всех исследованных интерфазных хромосом был в значительной степени больше (в некоторых клетках до 30% объема ядра вне зависимости от размера хромосомы). Это, по-видимому, объясняется тем, что в головном мозге наблюдается повышенная транскрипционная активность (Zhang, Meaney, 2010), которая, как известно, связана с увеличением объема, занимаемого хромосомной ДНК (деконденсацией) (Cremer, Cremer, 2010). Наиболее частыми областями, в которых локализовались хромосомы, являлась периферия и границы ядрышка, которые определялись, как область ядра, не окрашиваемая DAPI (краситель, взаимодействующий только с молекулами ДНК). В таблице 4 суммированы данные о локализации хромосом в интерфазных клетках головного мозга. Сравнительный анализ локализации аутосом по каждому типу расположения показал статистически недостоверные отличия ($P < 0,05$).

Таблица 4. Вариация расположения хромосом в интерфазных клетках головного мозга (n=300000).

Хромосома	Периферия ядра	Периферия ядрышка	Внутренняя область ядра
	Число клеток (%)		
1	14,8	68,1	17,1
9	12,3	51,7	36
16	15,2	78,4	6,4
18	19,9	50,2	29,9
19	10,2	82,3	7,5
X	54,3	4,1	41,6

Главной отличительной особенностью интерфазной организации генома на микроскопическом и субмикроскопических уровнях в тканях головного мозга явились ассоциации хромосомных участков (рис.9), которые в случаях некоторых локусов наблюдались в более чем 80% клеток.

Поскольку при анализе данного феномена, несмотря на высокую частоту ассоциаций хромосомных участков, нельзя было полностью исключить артефакты, связанные с фиксацией клеточных суспензий, был также проведен анализ расположения хромосом методами 3D FISH/ICS-MCB (рис.10). Данные 3D FISH/ICS-MCB подтвердили результаты МЦГ анализа с помощью ICS-MCB на клетках, фиксированных с помощью стандартных методик ($P < 0,01$). Таким образом, феномен ассоциации хромосомных участков был признан характерной особенностью организации генома в интерфазных клетках головного мозга. Перицентромерные участки ассоциировались в 38-61% случаев.

Суммарное количество ассоциированных коротких плеч составило 26-37%, длинных плеч — 15-25%. Хромосома 19 ассоциировала короткими и длинными плечами в примерно одинаковой пропорции клеток, в совокупности составляя 30-49%. Перицентромерный гетерохроматин хромосомы 19 (также и хромосомы 5) демонстрировал ассоциации в 15% клеток. Исключение составляла хромосома X,

ассоциации участков которой наблюдались менее, чем в 3% клеток. В связи с этим, было признано, что ассоциации локусов хромосомы X носят, по-видимому, случайный характер.

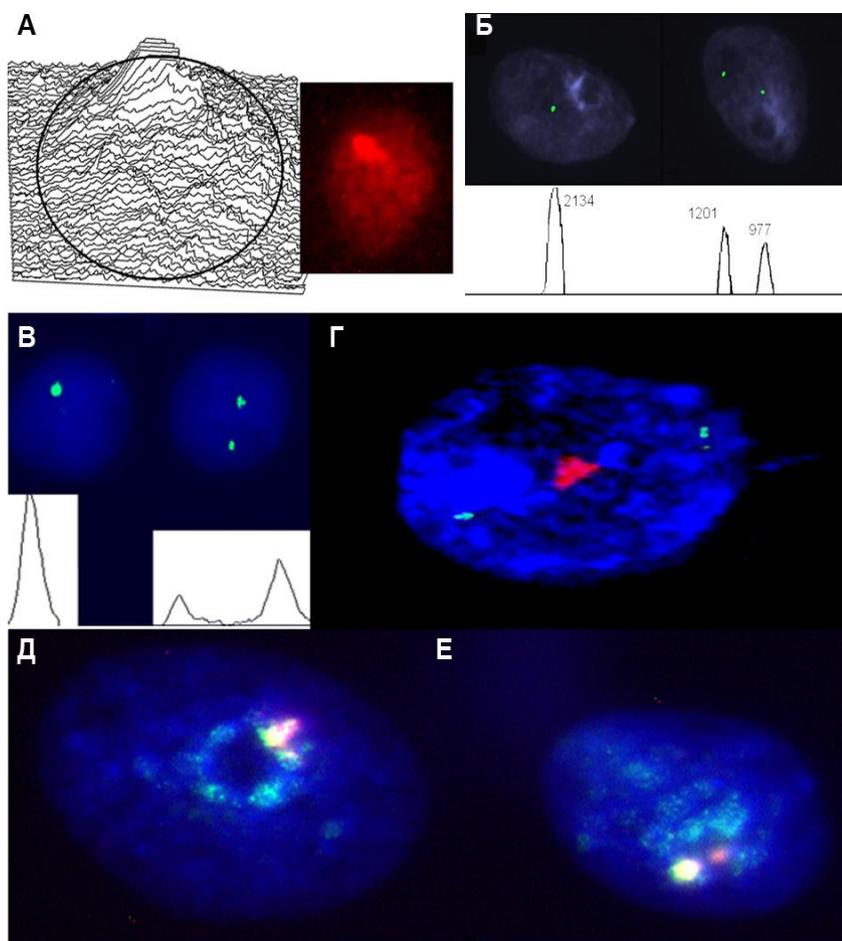


Рис.9. Ассоциации хромосомных участков в интерфазных ядрах клеток головного мозга. (А) ассоциация всех гетерохроматиновых участков генома; (Б) ассоциация гетерохроматинового участка хромосомы 9 (9qh) в ядре слева, (QFISH); (В) ассоциация гетерохроматинового участка хромосомы 16 (16qh) в ядре слева, (QFISH); (Г) ассоциация гетерохроматинового участка хромосомы 1 (1qh) и два сигнала сайт-специфических проб (участок 1p36); (Д и Е) ассоциации гетерохроматиновых участков классической сателлитной ДНК (1qh, 16qh и 9qh).

Проведен сравнительный анализ частот ассоциаций участков перичентромерного гетерохроматина в клетках крови, а также в нейронах (NeuN-положительных клетках) и глиальных (NeuN-отрицательных) клетках. Было обнаружено, что ассоциации хромосом с наибольшей частотой наблюдаются в нейронах (58%); в глиальных клетках она составила 25%, а в клетках крови — 12%. При сравнении различия были статистически достоверными ($P < 0,01$). Таким образом, было показано, что геномная организация в высокодифференцированных и транскрипционно активных нейронах связана с увеличением частоты хромосомных ассоциаций. Следовательно, было обосновано предположить, что данный феномен несёт функциональную нагрузку.

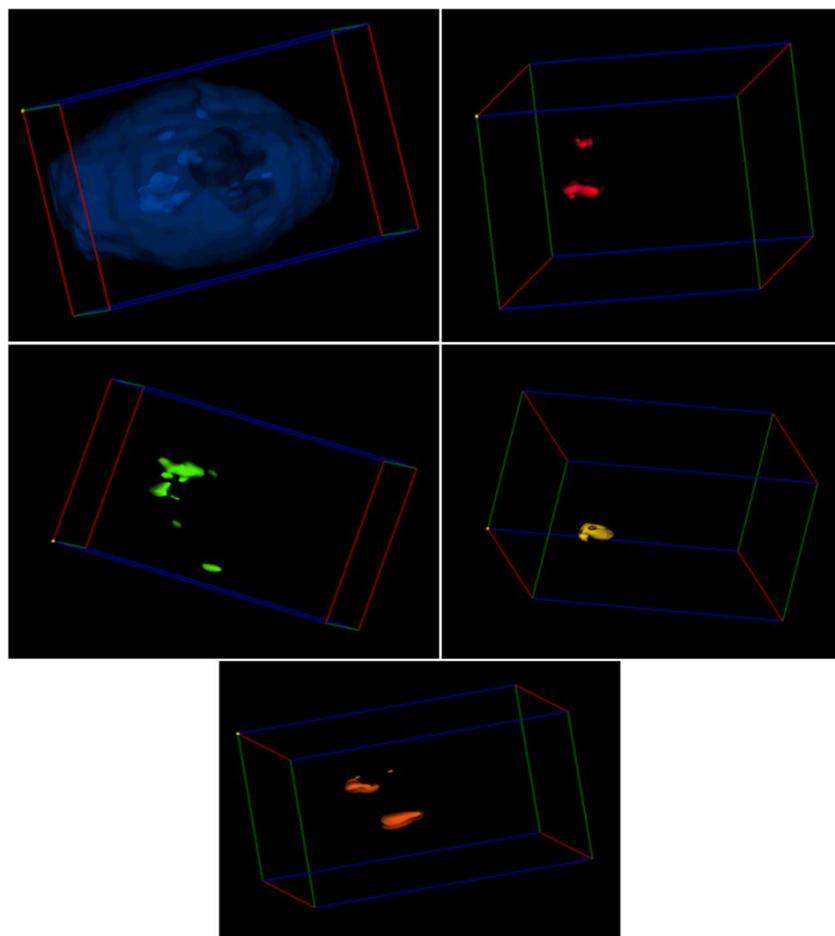


Рис.10. 3D ICS-MCB на клетках головного мозга с ДНК пробами на хромосому 18: все участки, кроме одного(гетерохроматиновые участки хромосомы 18; справа) присутствуют в двух копиях, следовательно, в данной клетке наблюдается ассоциация гетерохроматинового участка хромосомы 18.

Учитывая, что поведение геномных локусов в интерфазных клетках влияют на активность генов (Osborne et al., 2004; Spilianakis et al., 2005; Goetze et al., 2007; Xu, Cook, 2008; Schoenfelder et al., 2010), а также тот факт, что специфика геномной организации (например, генонасыщенность) влияет на локализацию хромосом в ядре (Küpper et al., 2007), исследования функционального значения этого феномена проводились в зависимости от специфики последовательности расположения генов на исследованных аутосомах (геномный анализ) и от вариации активности генов по длине хромосомы (эпигеномный анализ) с использованием оригинального биоинформатического метода. На рисунке 11 представлены результаты проведенного исследования на примере хромосом 18 и 19.

Было обнаружено, что частота ассоциаций хромосомных участков не коррелирует с генонасыщенностью (коэффициент Спирмена $R=0,0246$). При изучении эпигенетического статуса ассоциированных хромосомных участков была обнаружена корреляция с повышенной экспрессией генов этих локусов (коэффициент Спирмена $R=0,8997$). Таким образом, было продемонстрировано, что организация генома в интерфазных клетках головного мозга в виде ассоциаций хромосомных участков имеет функциональные последствия в виде увеличения экспрессии генов в нейронах. Следовательно, эпигенетический контроль транскрипционной активности генома в высокодифференцированных клетках происходит посредством изменения ядерной организации интерфазных хромосом. Необходимо отметить, что о данном феномене, выявленном с помощью изучения целых хромосом, а не специфических геномных локусов, сообщается впервые.

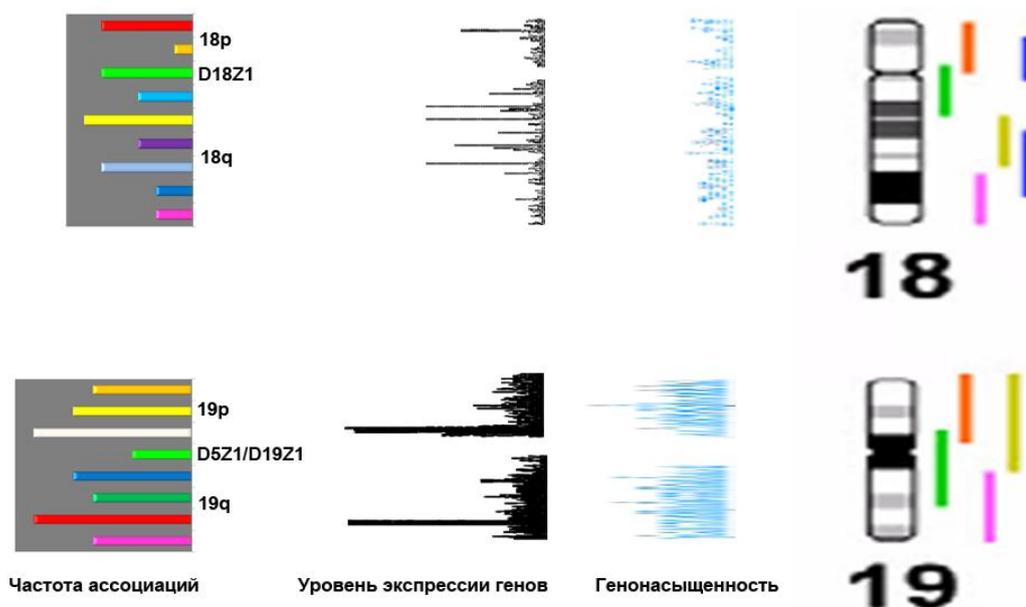


Рис.11. Корреляция частоты ассоциаций различных участков хромосом 18 и 19 (графики справа) с уровнем экспрессии генов и генонасыщенностью. Ассоциируют преимущественно участки, в которых содержатся гены с повышенной экспрессией в клетках головного мозга. Корреляции с генонасыщенностью не наблюдалось.

Поскольку в литературе постоянно отмечается возможная связь изменения эпигенетических процессов и патогенеза шизофрении (Abdolmaleky et al., 2006; Samargo et al., 2007; van Os, Kapur, 2009), было проведено изучение организации интерфазных хромосом в клетках головного мозга при этом заболевании. Методами MFISH/QFISH и ICS-MCB было продемонстрировано, что участки перичентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, и 16 в 2-3 раза чаще ассоциируют в клетках головного мозга при шизофрении ($P < 0,05$), тогда как эти участки хромосом 15 и 18 имели практически одинаковую частоту ($P > 0,1$), а в случае хромосомы 17 было обнаружено троекратное увеличение числа клеток с ассоциированными участками перичентромерного гетерохроматина в контроле ($P < 0,01$). Эухроматиновые участки хромосом 1 и 18 в два раза чаще ассоциировали в клетках головного мозга при шизофрении ($P < 0,05$), а в случае хромосом 9 и 16 статистически достоверных различий обнаружено не было ($P > 0,05$). Таким образом, впервые было показано, что вариации функциональной организации генома на супрамолекулярном уровне в виде изменения организации хромосом в клетках головного мозга могут быть одним из механизмов патогенеза такого генетически и клинически гетерогенного заболевания, как шизофрения. Необходимо отметить, что до настоящего времени ни одно нервно-психическое заболевание не ассоциировалось с данным эпигенетическим феноменом. Исследование функциональной организации генома проводилось также и при нейродегенеративных заболеваниях (БА и АТ). Сравнительный анализ показал, что при БА количество ассоциаций хромосомных участков значительно меньше по сравнению с контролем. Участки перичентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 15, 16, 17 и 18 варьировали в пределах от 4 до 20%, что в два-четыре раза меньше по сравнению с контролем ($P < 0,01$). Эухроматиновые участки при БА ассоциировали в 0,9-3%, являясь значительно меньше по сравнению с контролем ($P < 0,001$). Суммируя данные о

функциональной организации хромосом в клетках головного мозга при психических и нейродегенеративных заболеваниях, был сделан вывод о том, что эпигенетические феномены, связанные с вариацией локализации хромосом в интерфазных клетках, являются одним из возможных механизмов патогенеза болезней мозга. Следует отметить, что при шизофрении в качестве одного из основных эндофенотипов отмечается повышенная функциональная активность головного мозга (van Os, Kapur, 2009), тогда как при БА и АТ она в значительной степени снижена (Dillen, Annaert, 2006; Swerdlow, 2007; Lavin, 2008). Это коррелирует с данными об интерфазной организации хромосом в клетках головного мозга при этих заболеваниях. Следовательно, изменения функциональной организации хромосом в клетках головного мозга представляет собой процесс, который может быть связан с дисфункциями ЦНС, характерными для нервно-психических заболеваний.

Онтогенетические вариации структурной и функциональной организации хромосом

В эмбриональных тканях соматические вариации генома выявлялись в 19-35% клеток, тогда как в постнатальном периоде в норме их частота составляла примерно 10%. Следовательно, существование структурных онтогенетических вариаций генома не вызывает сомнений. Было показано, что уровень вариаций генома снижается в три раза в ходе внутриутробного развития. Причем, это связано с элиминированием аномальных клеток, а не гибелью плодов, связанной с низкопроцентным хромосомным мозаицизмом. Однако в постнатальном периоде наблюдается рост количества анеуплоидных клеток в головном мозге (0,5-0,9% для аутосом и 1,9% для хромосомы X — в эмбриональном периоде и 1,7% для аутосом и 3,5% для хромосомы X — в постнатальном периоде; коэффициент Спирмена $R=0,8121$). Суммируя данные, можно сказать, что онтогенетические вариации генома представляют собой один из основных биологических процессов, регулирующих количество клеток в течение пренатального развития, а также связаны со старением. Причины увеличения уровня анеуплоидии могут быть связаны с нарушениями апоптоза, который приводит к уменьшению общего числа клеток в головном мозге, но, поскольку число анеуплоидных клеток значительно ниже «нормальных», то они значительно реже элиминируются за счет данного процесса. Помимо этого, предполагается, что нейрогенез в постнатальном мозге, по-видимому, связан с митотической нестабильностью, которая наблюдается в митотических клетках в процессе старения (Lu et al., 2000). Таким образом, соматические вариации генома в клетках головного мозга являются связанными не только с межклеточным разнообразием организации и патологическими изменениями при нервно-психических заболеваниях, но также и с процессами старения. Функциональные вариации организации генома на супрамолекулярном уровне, по-видимому, также изменяются в течение онтогенеза, поскольку существует исчерпывающее количество данных об изменении локализации хромосом (хромосомных участков) в зависимости от времени (Cook, Marenduzzo, 2009; Wu et al., 2009a; Cremer, Cremer, 2010). Сравнительный анализ организации хромосом в интерфазных клетках эмбрионального и постмортального мозга показал 5-7 кратное увеличение хромосомных ассоциаций в постнатальном периоде. Это коррелировало с увеличением транскрипционной активности генома клеток головного мозга в зависимости от стадии онтогенеза. Таким образом, показано, что вариация функциональной организации хромосом, которая коррелирует с уровнем

экспрессии генов (эпигенетическим профилем) в исследованных тканях, является одним из определяющих факторов поведения генома.

Гипотеза о связи геномной нестабильности с патогенезом нервно-психических заболеваний

На основе полученных данных была предложена гипотеза о связи геномной нестабильности с патогенезом нервно-психических заболеваний. Она заключается в том, что соматические геномные вариации возникают в раннем пренатальном периоде, достигая наибольшей частоты в первом триместре (30-35%). Затем, за счет элиминации аномальных клеток, связанной с апоптозом, или другими процессами, ассоциированными с запрограммированной клеточной гибелью, происходит уменьшение уровня анеуплоидии до 10%. Однако, в позднем онтогенезе число анеуплоидных клеток увеличивается. Это, по-видимому, связано с процессами старения, что также подтверждается исследованием заболеваний аномального или ускоренного старения (БА и АТ, соответственно). При нервно-психических заболеваниях процесс элиминации аномальных клеток, по-видимому, нарушен. Из-за этого у детей с умственной отсталостью и аутистическими расстройствами мозаичная анеуплоидия наблюдается с повышенной частотой. Данное предположение также подтверждается картированием генов-кандидатов аутизма и последующим интерактомным/реактомным анализом, который указывает на то, что в клетках с данными геномными перестройками нарушаются регуляция клеточного цикла, сегрегация хромосом в митозе и запрограммированная гибель клеток. Подобный феномен, скорее всего, лежит в основе патогенеза шизофрении, БА и АТ. Наиболее вероятным механизмом формирования хромосомоспецифичной анеуплоидии и геномных перестроек является естественный отбор в клеточных популяциях в течение онтогенеза. Помимо этого, специфичность хромосом, вовлеченных в аномалию клеток головного мозга, определяет заболевание (например, анеуплоидия хромосомы 1 связана с шизофренией, а хромосомы 21 — с БА). Молекулярные процессы, приводящие к патологии головного мозга, при этих заболеваниях можно проследить при изучении АТ, поскольку, как было показано в настоящей работе, в данном случае обнаружены разрывы хромосом в специфических геномных локусах. В связи с этим были проведены соответствующие интерактомные и реактомные исследования. С помощью анализа межбелковых взаимодействий (интерактомный анализ) и каскада метаболических цепочек (реактомный анализ) было обнаружено, что перестройки хромосомы 14 разрывают гены *FOXG1B* и *NOVA1* (14q12), а в хромосомах 7 и X — разрывы располагались в ломких сайтах (*FRA7C*, *FRAXB*, *FRAXC*). По данным биоинформатического анализа разрывы сайтов ломкости связаны с тем, что ген АТ (*ATM*) регулирует их стабильность. Геномные сети с участием *FOXG1B* и *NOVA1* вовлекали метаболическую цепочку SMAD (гены *SMAD2* и *SMAD4* в участке 18q21.1), являющуюся ключевым элементом апоптоза и регуляции цикла клеток-предшественников нейронов, а также ген *NOVA1*, который регулирует альтернативный сплайсинг в нервных клетках. Вся цепочка внутриклеточных реакций вовлекала образование комплексов глобального регулятора генома p53 (регуляция транскрипции, сегрегации хромосом и апоптоза) и являлась компонентой каскада процессов, необходимых для репарации ДНК на стадиях клеточного цикла G1 и S. На рисунке 12 приведен пример такого исследования.

аутистическими расстройствами. Предложен комплекс оригинальных методов (QFISH и ICS-MCB), который лёг в основу создания оригинального подхода к выявлению соматических вариаций и организации генома в индивидуальных клетках. Последующее его применение позволило обнаружить такие ранее неизвестные феномены, связанные с внутриутробным развитием, как анеуплоидизация тканей плода, поражающая до 35% клеток мозга в каждом эмбрионе, а также то, что 25% спонтанных аборусов ассоциированы с хромосомным мозаицизмом. Далее, было показано, что низкопроцентная мозаичная анеуплоидия не является причиной внутриутробной гибели плода, и анеуплоидные клетки могут не подвергаться элиминации, приводя к патологии в постнатальном периоде. При умственной отсталости/ВПР мозаичные формы хромосомной патологии были обнаружены у 5,7% у детей. При аутизме низкопроцентная мозаичная анеуплоидия наблюдалась в 16% случаев. В этой группе также была определена частота вариаций гетерохроматиновых участков хромосом, которая в три раза выше по сравнению с контролем. Таким образом, патогенез аутизма может быть также связан с гетероморфизмом гетерохроматиновых участков генома. При анализе вариации эухроматиновых участков хромосом у детей с умственной отсталостью и аутистическими расстройствами методами высокоразрешающего сканирования генома и оригинального биоинформатического метода были выявлены гены-кандидаты. Дополнительные исследования с помощью интерактивного и реактивного анализа показали, что белки, кодируемые этими генами, вовлечены в критические внутриклеточные процессы регуляции клеточного цикла, сегрегации хромосом и запрограммированной клеточной гибели. Был сделан вывод о том, что при нервно-психических заболеваниях могут нарушаться эти процессы, приводя к хромосомному мозаицизму или нестабильности, подтверждая гипотезу, предложенную в настоящем исследовании. Исследования головного мозга показали, что до 10% клеток в норме могут иметь аномальный хромосомный набор, являясь, таким образом, следствием нормальной спорадической вариации генома. Нейроны и глиальные клетки в одинаковой степени подвержены этому процессу. Исследования хромосомного набора в клетках головного мозга при шизофрении показали связь с мозаичной анеуплоидией хромосом 1, 18 и X в клетках коры головного мозга. Дополнительные исследования продемонстрировали, что при шизофрении наблюдается повышенный уровень спорадической анеуплоидии хромосомы 1. Изучение головного мозга при БА выявило мозаичную анеуплоидию, поражающую клетки головного мозга, которая является одним из механизмов нейродегенерации. Нарушения ЦНС при этом заболевании связаны с хромосомоспецифичной мозаичной анеуплоидией хромосомы 21, которая наблюдалась в 5-35% клеток. Данная хромосомная патология, была обнаружена только в тканях коры и гиппокампа (области головного мозга, подверженные дегенерации при БА). Таким образом, был предложен механизм БА, основанный на анеуплоидизации клеток коры головного мозга и гиппокампа, за счет которого в этих областях наблюдается повышенный уровень анеуплоидии хромосомы 21, являющейся причиной нарушений функционирования нейронов головного мозга и их последующей гибели. Для подтверждения ассоциации между нестабильностью генома и нейродегенерацией были исследованы клетки головного мозга при АТ. Анализ коры и мозжечка при этом заболевании впервые показал, что CIN может являться причиной нейродегенерации. Нестабильность генома при АТ была представлена в виде анеуплоидии и разрывов в специфических локусах на хромосомах 7, 14 и X, селективно поражающей клетки определенных областей

головного мозга (мозжечка). Анализ особенностей организации гомологичных хромосом в интерфазных ядрах клеток головного мозга в норме и при различной патологии ЦНС выявил, что соматические ассоциации хромосомных локусов, затрагивающие гетерохроматиновые и эухроматиновые участки хромосом, являются характерной особенностью дифференцированных нейрональных клеток. Определение частоты хромосомных ассоциаций показало, что этот феномен играет решающую роль в эпигенетической регуляции транскрипционной активности генома клетки. Обнаружены характерные особенности изменения ядерной организации генома (эпигенома) в клетках головного мозга при нервно-психических заболеваниях в виде вариации частоты ассоциации гетерохроматиновых и эухроматиновых участков хромосом в нервных клетках, которые могут быть одним из возможных механизмов патогенеза шизофрении и нейродегенеративных болезней. Увеличение частоты ассоциаций хромосомных участков наблюдалось при психических заболеваниях, связанных с повышенной функциональной активностью головного мозга (шизофренией), тогда как при нейродегенеративных заболеваниях, в которых функциональная активность головного мозга в значительной степени снижена, хромосомные ассоциации имели статистически достоверно сниженную частоту. Онтогенетические вариации структуры и функциональной организации генома в клетках головного мозга, по-видимому, связаны с процессами регуляции числа клеток в пренатальном периоде и старением. Таким образом, несмотря на то, что ЦНС человека, в основном, состоит из дифференцированных неделящихся клеток, старение головного мозга может быть связано с онтогенетической анеуплоидизацией в ходе нейрогенеза на поздних стадиях онтогенеза. Суммируя все данные настоящей работы, была сформулирована оригинальная гипотеза, рассматривающая генетическую нестабильность в соматических клетках в виде мозаичной анеуплоидии и неслучайных геномных перестроек, как один из основных механизмов патогенеза различных нервных и психических болезней (в частности, аутизма, шизофрении, БА и АТ), связанных с дифференциальной экспрессией нестабильности генома (эпигенома) в мозге. Предложенная комплексная схема патогенеза исследованных заболеваний ЦНС, основанная на данных о вариациях структурно-функциональной организации генома в разных отделах мозга, позволяет учитывать как наследственную предрасположенность к данным заболеваниям, так и факторы окружающей среды, которые имеют отрицательный эффект на сегрегацию хромосом в митозе, сохранение целостности хромосом в течение клеточного цикла и запрограммированную гибель аномальных клеток. В заключение необходимо отметить, что разработанный комплекс методов является эффективным для изучения структурной и функциональной организации хромосом в норме и при различных заболеваниях, а также для диагностики хромосомных аномалий и геномных перестроек. Данные настоящего исследования о структурно-функциональной вариации генома при нервно-психических заболеваниях имеют значение для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований механизмов патогенеза, дифференциальной диагностики, медико-генетического консультирования и молекулярной терапии этих распространенных болезней мозга.

ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный комплекс молекулярно-цитогенетических методов для выявления анеуплоидии и структурных перестроек интерфазных хромосом в клетках мозга человека, который включает в себя (1) многоцветную

интерфазную флюоресцентную гибридизацию *in situ* (MFISH), (2) количественную флюоресцентную гибридизацию *in situ* (QFISH), (3) интерфазную хромосомоспецифичную многоцветовую детекцию дифференциально маркированных по длине хромосом (ICS-MCB), (4) иммуно-FISH (Immuno-FISH).

2. Определен спонтанный уровень анеуплоидии в эмбриональных нервных клетках развивающегося мозга человека. Выявлены феномены повышенной хромосомной нестабильности и хромосомоспецифического мозаицизма в эмбриональном мозге, а также индуцированной мозаичной анеуплоидии в органотипических культурах эмбриональных и фетальных нервных клетках человека в условиях *in vitro*.
3. Частота хромосомных аномалий и геномных перестроек у детей с умственной отсталостью и/или ВПР составляет 13,1%. Показано, что соматический мозаицизм, связанный с митотической нестабильностью, наблюдается в 5,7%, а хромосомные аномалии, вызванные ошибками мейотического деления, — в 7,4%, из которых 4,7% составили структурные хромосомные аномалии и геномные перестройки и 2,9% — анеуплоидия.
4. Показано, что низкопроцентная мозаичная анеуплоидия встречается с повышенной частотой (до 16%) в культивируемых лимфоцитах у детей с идиопатическим аутизмом, причем до 10% мальчиков с аутизмом имеют низкопроцентные мозаичные клеточные клоны с дополнительной хромосомой X в кариотипе. Частота хромосомных вариантов с вовлечением гетерохроматиновых участков хромосом 1, 9 и 16 достоверно выше при аутизме, чем в контроле.
5. Обоснован оригинальный биоинформатический метод анализа геномного дисбаланса при несбалансированных хромосомных перестройках. Предложен алгоритм интерпретации последствий и определения причин возникновения структурной и функциональной вариации генома, который включает в себя биоинформатический геномный и эпигеномный анализ с последующей интерактивной и реактивной оценкой.
6. Определена частота спонтанной анеуплоидии в клетках нормального головного мозга взрослых индивидуумов без нарушений психики, которая составляет около 0,5% в расчете на индивидуальную пару гомологичных хромосом. Получены данные в пользу редукции мозаичной анеуплоидии в ходе развития ЦНС от 30-35% в эмбриональном до 10-12% во взрослом мозге. Показано, что мозаичная анеуплоидия, ведущая к структурной вариабельности генома нервных клеток, является одним из возможных генетических механизмов формирования межклеточного разнообразия в нормальном мозге на ранних стадиях онтогенеза.
7. Показано, что в головном мозге больных шизофренией (кора больших полушарий, хвостатое ядро и гиппокамп) анеуплоидия хромосом 1, 18 и X имеет повышенную частоту. Обоснована гипотеза о том, что структурные вариации соматического генома, приводящие к нарушениям его функциональной активности в нервных клетках головного мозга, связаны с патогенезом этой психической болезни, и мозаичная анеуплоидия является возможным биологическим маркером нарушений ЦНС при шизофрении.
8. Определен уровень анеуплоидии в разных отделах мозга при болезни Альцгеймера (кора больших полушарий, гиппокамп, мозжечок). Показано, что геномная нестабильность при болезни Альцгеймера проявляется специфически в виде анеуплоидии с участием хромосомы 21 в клетках областей мозга, пораженных нейродегенерацией (гиппокамп и кора больших полушарий). Таким

образом, соматическая нестабильность генома в клетках головного мозга является одним из возможных механизмов патогенеза этого нейродегенеративного заболевания позднего возраста. Подтверждена гипотеза о связи болезни Альцгеймера с трисомией по хромосоме 21, предполагающая общий механизм патогенеза при болезнях Дауна и Альцгеймера.

9. Определен уровень анеуплоидии и структурных хромосомных перестроек в клетках головного мозга (кора больших полушарий, мозжечок) при атаксии-телеангиэктазии. Показано, что прогрессирующая мозжечковая дегенерация раннего возраста, характерная для этой болезни, связана с мозаичным эффектом хромосомной нестабильности в виде анеуплоидии и разрывов в специфических локусах на хромосомах 7, 14 и X, селективно поражающей клетки определенных областей головного мозга (нейроны мозжечка). Предложена гипотеза о том, что мозаичная экспрессия геномной и хромосомной нестабильности в разных отделах ЦНС может лежать в основе патогенеза различных нейродегенеративных болезней.
10. Обнаружено, что соматические ассоциации (спаривание) гетерохроматиновых и эухроматиновых участков хромосом, являются характерной особенностью дифференцированных нейрональных клеток. Определены частоты соматического спаривания для разных хромосом и показано нарушение правила «хромосомных территорий» для определенных гомологичных хромосом в нейронах коры и мозжечка головного мозга человека.
11. При исследовании архитектоники интерфазного ядра клеток головного мозга показано, что характерные изменения ядерной организации генома (эпигенома) и нарушения соматического спаривания эухроматиновых участков хромосом в нервных клетках наблюдаются у больных с психическими заболеваниями, что может являться одним из вероятных эпигенетических механизмов патогенеза этих болезней.
12. На основе полученных данных предложена оригинальная гипотеза, рассматривающая генетическую нестабильность в соматических клетках как один из основных механизмов патогенеза нервных и психических болезней, связанных с дифференциальной экспрессией нестабильности генома (эпигенома) в головном мозге. Предложена комплексная схема патогенеза исследованных заболеваний ЦНС, включая аутизм, шизофрению, болезнь Альцгеймера и атаксию-телеангиэктазию, основанная на данных о соматических вариациях и нестабильности структурно-функциональной организации генома на хромосомном уровне в разных отделах мозга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

МОНОГРАФИИ

1. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинико-биологические аспекты. М.: Медпрактика, 2008, 300с.

СТАТЬИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ЖУРНАЛАХ/ГЛАВЫ В

МОНОГРАФИЯХ

2. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Vorsanova S.G., Monachov V.V., **Iourov I.Y.** Multicolor fluorescent in situ hybridization on post-mortem brain in schizophrenia as an

approach for identification of low-level chromosomal aneuploidy in neuropsychiatric diseases. *Brain Dev.* **2001**; 23(S1):S186-S190.

3. Vorsanova S.G., Kirillova E.A., Yurov Y.B., Kolotii A.D., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.**, Beresheva A.K. Chromosome abnormalities in spontaneous abortions: application of multicolor fluorescent in situ hybridization and original DNA probes for chromosomes 1, 9, 13, 14, 16, 18, 21, 22, X and Y. *Balkan J Med Genet.* **2003**; 6(3&4):49-54.

4. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Beresheva A.K., **Iourov I.Y.**, et al. Aliphoid DNA variation and non-disjunction in Down's syndrome: fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies. *Balkan J Med Genet.* **2003**; 6(3&4):81-86.

5. Yurov Y.B., Vostrikov V.S., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Evidence for large scale chromosomal variations in neuronal cells of the fetal human brain. *Balkan J Med Genet.* **2003**; 6(3&4):95-99.

6. Ворсанова С.Г., Соловьев И.В., **Юров И.Ю.** и др. Цитогенетическая и молекулярная диагностика различных форм умственной отсталости у детей. *Южно-Российский Медицинский Журнал.* **2004**; 2:61-66.

7. Ворсанова С.Г., Берешева А.К., Монахов В.В., **Юров И.Ю.** и др. Вариабельность альфоидной ДНК и нерасхождение хромосом 21 у детей с синдромом Дауна: цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования. В «Сборнике научных трудов сотрудников КМАПО им. П. Л. Шупика», Киев, Украина, 2004; Выпуск 13. Книга 5: 50-56.

8. **Юров И.Ю.**, Виллард Л., Ворсанова С.Г. и др. Особенности инактивации хромосомы X у пожилых женщин старше 70 лет. *Цитол Генет.* **2004**; 38(4):49-54.

9. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Монахов В.В. и др. Молекулярно-цитогенетическое исследование робертсоновской транслокации 13;14 и синдрома Дауна у ребенка 3-х лет. *Цитол Генет.* **2004**; 38(6):54-59.

10. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Genomic variations as a possible cause of cell death in the human brain: the study of chromosomes in neuronal cells of the developing and adult brain using interphase Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization (MFISH). *Int J Neuroprotect Neuroregener.* **2005**; 1(2):108-109.

11. Vorsanova S.G., Kolotii A.D., **Iourov I.Y.** et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem* **2005**; 53(3):375-380.

12. Yurov Y.B., **Iourov I.Y.**, Monakhov V.V. et al. The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study. *J Histochem Cytochem* **2005**; 53(3):385-390.

13. **Iourov I.Y.**, Soloviev I.V., Vorsanova S.G., et al. An approach for quantitative assessment of fluorescence in situ hybridization (FISH) signals for applied human molecular cytogenetics. *J Histochem Cytochem* **2005**; 53(3):401-408.

14. Ворсанова С.Г., Колотий А.Д., **Юров И.Ю.** и др. Диагностика численных хромосомных аномалий в клетках спонтанных абортусов с помощью многоцветовой флюоресцентной гибридизации in situ (MFISH). *Клин Лаб Диагн.* **2005**; 11:30-32.

15. **Юров И.Ю.**, Соловьев И.В., Монахов В.В. и др. Количественный анализ сигналов флюоресцентной гибридизации in situ (FISH) для молекулярно-цитогенетической диагностики. *Клин Лаб Диагн.* **2005**; 11:33-36.

16. Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.**, Beresheva A.K. et al. Non-disjunction of chromosome 21, aliphoid DNA variation, and sociogenetic features of Down syndrome. *Цитол Генет.* **2005**; 39(6):30-36.

17. **Iourov I.Y.**, Liehr T., Vorsanova S.G. et al. Visualization of interphase chromosomes in postmitotic cells of the human brain by multicolour banding (MCB). *Chromosome Res.* **2006**; 14(3):223-229.
18. Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.**, Demidova I.A. et al. Pericentric inversion inv(7)(p11q21.1): report on 2 cases and genotype-phenotype correlations. *Цитол Генет.* **2006**; 40(№3):45-48.
19. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Pellestor F., Yurov Y.B. Brain tissue preparations for chromosomal PRINS labeling. *Methods Mol. Biol.* [in: *Methods in Molecular Biology*, vol. 334: PCR and *In Situ* PCR protocols, II Edition (Pellestor F., ed.). Totowa, NJ: Humana Press.] **2006**; 334:123-132.
20. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Демидова И.А. и др. Вариабельность гетерохроматиновых районов хромосом и хромосомные аномалии у детей с аутизмом: идентификация генетических маркеров аутистических расстройств. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* **2006**; 106(6):52-57.
21. Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.**, Demidova I.A. et al. Chimerism and multiple numerical chromosome imbalances in a spontaneously aborted fetus. *Цитол Генет.* **2006**;40(5):28-30.
22. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Kirillova E.A., Yurov Y.B. First case of del(1)(p36.2p33) in a fetus delivered stillborn. *Prenat Diagn.* **2006**; 26(11):1092-1093.
23. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Vostrikov V.M., Monakhov V.V., Soloviev I.V., **Iourov I.Y.** *In vitro* cultivation of fetal brain cells induces aneuploidy: a caution for neural stem cell therapy? *Int J Neuroprotect Neuroregener.* **2006**; 2(3):209-211.
24. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Molecular neurocytogenetics demonstrates oncogenic parallels in schizophrenia: implications for neuroprotection and neuroregeneration. *Int J Neuroprotect Neuroregener.* **2006**; 2(3):212-214.
25. Yurov Y.B., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. et al. Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PLoS ONE.* **2007**; 2(6):e558.
26. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.** et al. Unexplained autism is frequently associated with low-level mosaic aneuploidy. *J Med Genet.* **2007**; 44(8):521-525.
27. **Iourov I.Y.**, Liehr T., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Interphase chromosome-specific multicolor banding (ICS-MCB): a new tool for analysis of interphase chromosomes in their integrity. *Biomol Eng.* **2007**; 24(4):415-417.
28. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Ataxia telangiectasia paradox can be explained by chromosome instability at the subtissue level. *Med Hypotheses.* **2007**; 68(3):716.
29. Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.**, Demidova I.A. et al. Variability in the heterochromatin regions of the chromosomes and chromosomal anomalies in children with autism: identification of genetic markers of autistic spectrum disorders. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2007**; 37(6):553-558.
30. Liehr T., Mrasek K., Hinreiner S., Reich D., Ewers E., Bartels I., Seidel J., Emmanuil N., Petersen M., Polityko A., Dufke A., **Iourov I.** et al. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with 45,X/46,X,+mar karyotype — 17 new cases and a review of the literature. *Sex Dev.* **2007**; 1(6):353-362.
31. Yurov Y.B., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. et al. The schizophrenia brain exhibits low-level aneuploidy involving chromosome 1. *Schizophr Res.* **2008**; 98(1-3):137-147.
32. **Iourov I.Y.**, Yurov Y.B., Vorsanova S.G. Mosaic X chromosome aneuploidy can help to explain the male-to-female ratio in autism. *Med Hypotheses.* **2008**; 70(2):456.

33. Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.**, Voinova-Ulas V.Y. et al. Partial monosomy 7q34-qter and 21pter-q22.13 due to cryptic unbalanced translocation t(7;21) but not monosomy of the whole chromosome 21: a case report plus review of the literature. *Mol Cytogenet.* **2008**; 1(1):13.
34. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Liehr T. et al. Dynamic mosaicism manifesting as loss, gain and rearrangement of an isodicentric Y chromosome in a male child with growth retardation and abnormal external genitalia. *Cytogenet Genome Res.* **2008**; 121(3-4):302-306.
35. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., **Iourov I.Y.** Maternal smoking as a cause of mosaic aneuploidy in spontaneous abortions. *Med Hypotheses.* **2008**; 71(3):607.
36. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Колотий А.Д. и др. Мозаичная анеуплоидия в клетках головного мозга при атаксии-телеангиэктазии (синдроме Луи-Бар). *Медицинская Генетика.* **2008**; 7(73):22-26.
37. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Fluorescence intensity profiles of in situ hybridization signals depict genome architecture within human interphase nuclei. *Цитол Генет.* **2008**; 42(5):3-8.
38. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Soloviev I.V., Yurov Y.B. Interphase FISH: detection of intercellular genomic variations and somatic chromosomal mosaicism.//in: Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide (Springer Protocols). Edited by T. Liehr. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 2009. P.301-311.
39. Демидова И.А., Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.** и др. Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования недифференцированных форм умственной отсталости у детей. *Российский Вестник Перинатологии и Педиатрии.* **2009**; 54(1):69-75.
40. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Developmental chromosome instability as a possible cause of childhood brain cancers. *Med Hypotheses.* **2009**; 72(5):615-616.
41. Ворсанова С.Г., Воинова В.Ю., **Юров И.Ю.** и др. Цитогенетические, молекулярно-цитогенетические и клинико-генеалогические исследования матерей детей с аутизмом: поиск семейных генетических маркеров аутистических расстройств. *Журнал Неврологии и Психиатрии им С.С. Корсакова.* **2009**; 109(6):54-64.
42. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Воинова В.Ю. и др. Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования аутистических расстройств: идентификация семейных диагностических маркеров. *Вопросы Диагностики в Педиатрии.* **2009**; 1(3):20-25.
43. Yurov Y.B., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Neurodegeneration mediated by chromosome instability suggests changes in strategy for therapy development in ataxia-telangiectasia. *Med Hypotheses.* **2009**; 73(6):1075-1076.
44. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Liehr T., Yurov Y.B. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiol Dis.* **2009**; 34(2):212-220.
45. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Liehr T. et al. Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain. *Hum Mol Genet.* **2009**; 18(14):2656-2669.
46. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Соловьев И.В. Юров Ю.Б. Молекулярно-цитогенетические методы изучения интерфазных хромосом в клетках головного мозга человека. *Генетика.* **2010**;46(9):1171-1174.
47. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Саприна Е.А., Юров Ю.Б. Выявление генов-кандидатов аутизма, основанное на молекулярно-цитогенетическом и in silico

анализах геномной организации хромосомных участков, вовлеченных в несбалансированные перестройки. *Генетика*. 2010;46(10):1348-1351.

48. Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Соловьев И.В., **Юров И.Ю.** Нестабильность хромосом в нервных клетках человека в норме и при нервно-психических заболеваниях. *Генетика*. 2010;46(10):1352-1355.

49. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Колотий А.Д. и др. Хромосомный мозаицизм в материале спонтанных аборт: interfазный молекулярно-цитогенетический анализ 650 случаев. *Генетика*. 2010;46(10):1356-1359.

50. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Genomic landscape of the Alzheimer's disease brain: chromosome instability - aneuploidy, but not tetraploidy - mediates neurodegeneration. *Neurodegener Dis*. 2011;8(1-2):35-37.

ОБЗОРЫ

51. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Умственная отсталость, сцепленная с хромосомой X, эпигенетические феномены и аутизм. *Психиатрия*. 2005;1(13):55-65.

52. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Современные достижения в молекулярно-цитогенетической диагностике наследственных болезней. *Клин Лаб Диагн*. 2005;11:21-29.

53. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Хромосомные аномалии при шизофрении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2006; 106(3):75-82.

54. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Chromosomal variation in mammalian neuronal cells: known facts and attractive hypotheses. *Int Rev Cytol*. [International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology Volume 249 (Jeon K.W., ed.) Amsterdam — Boston — Heidelberg—London — New York — Oxford — Paris — San Diego — San Francisco — Singapore — Sydney — Tokyo: Academic Press (Elsevier)] 2006; 249:143-191.

55. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Соматические хромосомные мутации у человека: частота и возможные генетические последствия. В: «Современные достижения генетических исследований: клинические аспекты. Наследственные болезни крови и генетика опухолей кроветворной системы», под редакцией Шатохина Ю.В., Куцева С.И. Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ Росздрава. 2006, 79-97.

56. **Юров И.Ю.**, Ворсанова В.Г., Юров Ю.Б. Психиатрическая генетика: теория и практика. *Психическое Здоровье*. 2006; 3:41-46.

57. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Intercellular genomic (chromosomal) variations resulting in somatic mosaicism: mechanisms and consequences. *Curr Genomics*. 2006; 7(7):435-446.

58. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Молекулярная цитогенетика в диагностике хромосомных и генных болезней у детей. *Российский Вестник Перинатологии и Педиатрии*. 2006; 51(6):23-29.

59. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Молекулярная нейроцитогенетика: нестабильность генома в мозге при психических заболеваниях. *Психиатрия*. 2007; №4(28):36-43.

60. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Recent patents on molecular cytogenetics. *Recent Patents DNA Gene Seq*. 2008; 2(1):6-15.

61. Yurov Y.B., Liehr T., Shaffer L.G., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. A new open access journal for a rapidly evolving biomedical field: introducing Molecular Cytogenetics. *Mol Cytogenet*. 2008; 1(1):1.

62. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Detection of aneuploidy in neural stem cells of the developing and adult human brain. *Electronic J Biol.* 2008; 4(2):36-42.
63. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases. *Curr Genomics.* 2008; 9(7):452-465.
64. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet.* 2008; 1(1):26.
65. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Анеуплоидизация клеток плода: медико-биологические аспекты. *Ультразвук Перинатал Диагн.* 2009, 233-245.
66. **Iourov I.Y.** Microscopy and imaging systems. in: Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide (Springer Protocols). Edited by T. Liehr. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 2009, 75-84.
67. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.** GIN'n'CIN hypothesis of brain aging: deciphering the role of somatic genetic instabilities and neural aneuploidy during ontogeny. *Mol Cytogenet.* 2009; 2(1):23.
68. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., **Iourov I.Y.** Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cytogenet.* 2010; 3(1):1.
69. Yurov Y.B., **Iourov I.Y.** Editorial: Somatic genome variations: first steps towards a deeper understanding of an underappreciated source of biodiversity and disease. *Curr Genomics.* 2010; 11(6):377-378.
70. **Iourov I.Y.** Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Somatic genome variations in health and disease. *Curr Genomics.* 2010; 11(6):387-396.
71. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., **Iourov I.Y.** Ontogenetic variation of the human genome. *Curr Genomics.* 2010; 11(6):420-425.
72. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Soloviev I.V., **Iourov I.Y.** Molecular cytogenetic diagnosis and somatic genome variations. *Curr Genomics.* 2010; 11(6):440-446.

ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

73. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Khazatsky I., **Iourov I.**, Vorsanova S.G. Identification of individual chromosomes in neurons and glial cells of brain. *Mol. Psychiatry.* 1999; 4(Suppl.1):S62.
74. Yurov Yu.B., Vostrikov V.M., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Multicolour fluorescence in situ hybridization on post-mortem brain samples as an approach for identification of low level chromosomal aneuploidy at neurological diseases. World Congress on Rett Syndrome, Karuizawa, Nagano, Japan. 2000. P.49.
75. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Monachov V.V., Sharonin V.O., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Identification of low level of aneuploidy involving autosomes and sex chromosomes in brain and blood cells of patients with schizophrenia by FISH. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 96(4):477-478.
76. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Vorsanova S.G., Monachov V.V., **Iourov I.Y.** Interphase FISH identification of individual human chromosomes in post-mortem brain at patients of schizophrenia. *Ann. Genet.* 2001; 44(suppl.1):S118.
77. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Vorsanova S.G., Monachov V.V., Sharonin V.O., **Iourov I.Y.** Detection of autosomes and sex chromosomes by interphase FISH in post-mortem brain. 14th International Chromosome Conference. Supplement to the Program. Wurtzburg Germany. 2001, 188.
78. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Vorsanova S.G., Monachov V.V., **Iourov I.Y.** Multicolor fluorescent in situ hybridization in neuronal cells as an approach for identification of low level chromosomal aneuploidy in the brain. *Eur. J. Hum. Genet.* 2002; 10(Suppl.1):94-95.

79. Yurov Y.B., Vostricov V.M., Vorsanova S.G., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.** Interphase multicolor FISH study of individual human chromosomes in post-mortem brain at schizophrenia and Rett syndrome. International conference "Providing for the Needs of People with Rett Syndrome": abstract book. London, UK, 2002, 118.
80. Yurov Y.B., Vostrikov V.S., Monachov V.V., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. High level of chromosomal aberrations in neuronal cells of the fetal human brain. *Ann. Genet.* 2003; 46(2-3):282.
81. Yurov Y.B., Vostrikov V.S., Monachov V.V., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Large-scale genomic variations in developing and adult neuronal cells of the human brain: the possible involvement in pathogenesis of neuropsychiatric diseases. *Am. J. Med. Genet.* 2003; 122B(1):119.
82. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Соловьев И.В., Демидова И.А., Берешева А.К., Колотий А.Д., Шаронин В.О., Кравец В.С., Монахов В.В., **Юров И.Ю.**, Рузес Ж. Молекулярная цитогенетика в диагностике хромосомной патологии у детей с умственной отсталостью и врожденными аномалиями развития. Материалы второго Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2003, 139.
83. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Genomic variations as a possible cause of cell death in the human brain: the study of chromosomes in neuronal cells of the developing and adult brain using interphase MFISH. The Global College of Neuroprotection and Neuroregeneration Annual Conference 2004. Zermatt, Switzerland, 15-16.
84. **Iourov I.Y.**, Soloviev I.V., Vorsanova S.G. et al. An approach for rapid quantitative assessment of fluorescence in situ hybridization signals. *Med. Genet.* 2004; 16(1):105.
85. Vorsanova S.G., Kolotii A.D., **Iourov I.Y.** et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *Med. Genet.* 2004; 16(1):107-108.
86. **Юров И.Ю.**, Соловьев И.В., Ворсанова С.Г. и др. Метод количественной оценки сигналов флюоресцентной гибридизации in situ. *Современные достижения генетических исследований: клинические аспекты*, под редакцией Чернышева В.Н., Куцева С.И. 2004, 115.
87. Юров Ю.Б., Востриков В.М., Монахов В.В., **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г. Молекулярно-цитогенетический анализ нервных клеток эмбрионального и взрослого мозга человека. III съезд ВОГиС Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития Москва, 2004, II, 245.
88. Yurov Y.B., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.** et al. Molecular cytogenetic evidences for the presence of chromosomal mosaicism in the human brain. *Am. J. Med. Genet.* 2004; 130B(1):70.
89. Юров Ю.Б., Соловьев И.В., **Юров И.Ю.** и др. Количественный анализ сигналов флюоресцентной гибридизации in situ (FISH) для молекулярно-цитогенетической диагностики численных хромосомных аномалий. *Клин. Лаб. Диагн.* 2004; 9:60.
90. **Юров И.Ю.**, Соловьев И.В., Монахов В.В. и др. Возможности метода количественной оценки сигналов флюоресцентной гибридизации in situ (FISH) при молекулярно-цитогенетической диагностике хромосомной патологии. Материалы третьего Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2004, 111.
91. Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Востриков В.М., **Юров И.Ю.** и др. Современные технологии в изучении нервных клеток: сравнительный анализ хромосом в

эмбриональном и взрослом головном мозге с помощью интерфазной FISH. Материалы третьего Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2004, 111.

92. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Monakhov V.V., **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G. Chromosomal mosaicism in the developing human brain: high aneuploidy incidence could explain neuronal loss during ontogenesis. The American society of human genetics 54th annual meeting. 2004, 169.

93. **Iourov I.Y.**, Villard L., Vorsanova S.G. et al. X chromosome inactivation patterns in elderly females aged over 70 years. The American society of human genetics 54th annual meeting. 2004, 215.

94. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Соловьев И.В., Демидова Е.А., Берешева А.К., **Юров И.Ю.** и др. Возможности молекулярно-цитогенетической диагностики наследственной патологии у детей. Вопросы Современной Педиатрии. 2005; 4:101.

95. **Iourov I.Y.**, Monakhov V.V., Kolotii A.D. et al. The gain and loss of chromosomes and somatic chromosome pairing in developing human brain. Eur. J. Hum. Genet. 2005; 13(Suppl.1):167.

96. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Монахов В.В. и др. Нерасхождение хромосомы 21 у детей с синдромом Дауна: результаты цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований. Мед. Генет. 2005; 4(4):169.

97. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Monakhov V.V. et al. Identification of heterochromatin DNA variants of chromosomes 1, 9, and 16 in interphase nuclei by quantitative FISH analysis. Chromosome Res. 2005; 13(Suppl.1):59-60.

98. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Лиер Т. и др. Современные молекулярно-цитогенетические технологии для диагностики мозаичных форм хромосомной патологии. Материалы четвертого Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2005, 74.

99. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Соловьев И.В. и др. Современные молекулярно-цитогенетические технологии для идентификации хромосомных аномалий и структурной организации хромосом в нейронах головного мозга. Материалы XIV съезда психиатров России. 2005, 502.

100. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Liehr T. et al. Detection du mosaïcisme chromosomique spontané dans le cerveau human foetal par les techniques de FISH, PRINS et MCB. Med. Sci. 2006; 22(H-d-S-2):57.

101. **Iourov I.Y.**, Vorsanova S.G., Yurov Y.B. The FISH based analysis of genome (chromosome) instability in the autopsy brain and neuronal cell death in ataxia-telangiectasia. The third annual meeting of The Global College of Neuroprotection and Neuroregeneration. 2006. Uppsala, Sweden, 46.

102. Ворсанова С.Г., **Юров И.Ю.**, Демидова И.А. и др. Идентификация генетических маркеров аутистических расстройств: хромосомные варианты и аномалии у детей с аутизмом. Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии. Том I. Курск: КГМУ. 2006, 457-460.

103. **Юров И.Ю.**, Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Анализ геномной нестабильности на хромосомном уровне: поиск потенциальных анеугенов среди лекарственных средств. Тринадцатый Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». 2006. Москва, 344.

104. Yurov Y.B., **Iourov I.Y.**, Kolotii A.D. et al. Interphase FISH study of aneuploidy rate in the brain tissues of patients with AT. Balkan J. Med. Genet. 2006; 9(3&4):61.

- 105. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Yurov Y.B.** The schizophrenia brain demonstrates discrepant somatic chromosome pairing. *Am. J. Med. Genet. Part B: Neuropsychiat. Genet.* 2006; 141B(7):770.
- 106. Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю.** Молекулярно-цитогенетические технологии в диагностике хромосомных и генных заболеваний. Всероссийская научно-практическая конференция «Высокие медицинские технологии». Выставка «Медицинский госзаказ». Сборник тезисов. 2006. Москва, 68.
- 107. Юров И.Ю., Лиер Т., Ворсанова С.Г. и др.** Хромосомоспецифическое многоцветное окрашивание — новый метод определения хромосомных аномалий в неделящихся клетках. Материалы пятого Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2006, 67.
- 108. Юров И.Ю., Пеллестор Ф., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б.** Применение методов мечения хромосом с помощью PRINS и PNA для диагностики хромосомного мозаицизма у детей. Материалы пятого Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2006, 67-68.
- 109. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Колотий А.Д., Юров Ю.Б.** Молекулярно-нейроцитогенетические исследования атаксии-телеангиектазии как адекватной модели нейродегенеративных болезней в детстве. Материалы XI Конгресса Педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии». 2007, 788.
- 110. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б.** Молекулярная нейроцитогенетика: новое направление в клеточной нейрофизиологии. XX Съезд Физиологического Общества имени И.П. Павлова. 2007, 29.
- 111. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T. et al.** Molecular neurocytogenetic survey of intercellular genomic variations manifesting as aneuploidy in the human brain. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007; 15(Suppl.1):116-117.
- 112. Iourov I.Y., Liehr T., Vorsanova S.G. et al.** Interphase chromosome-specific multicolor banding (MCB): a new opportunity for molecular neurocytogenetics. *Chromosome Res.* 2007; 15(Suppl.1):28-29.
- 113. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Лиер Т. и др.** Хромосомная нестабильность в нервных клетках при атаксии-телеангиектазии. Материалы науково-практичної конференції з міжнародною участю: «Актуальні питання медичної генетики». 2007, Киев, Украина, 139-140.
- 114. Iourov I., Vorsanova S., Liehr T. et al.** First direct evidences for aneuploidy of chromosome 21 to affect the Alzheimer's disease cerebral cortex and hippocampus, but not the cerebellum. Abstracts of Annual Conference of the German Genetics Society — Genetics of Aging. 2007. Jena, Germany, 30.
- 115. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б.** Возможные генетические механизмы преобладания мальчиков среди детей с аутизмом. Материалы шестого Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2007, 69-70.
- 116. Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Демидова И.А. и др.** Хромосомные мутации у детей с аутизмом. Материалы XII конгресса педиатров России: «Актуальные проблемы педиатрии». 2008, 426-427.
- 117. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T. et al.** Chromosome instability in the ataxia telangiectasia cerebellum. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008; 16(Suppl.2):144.
- 118. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T. et al.** Association of genome instability and neurodegeneration in the cerebral cortex and hippocampus of Alzheimer's disease: evidences for a new pathogenic mechanism of the disease. *Int. J. Psychophysiol.* 2008; 69(3):288.

- 119. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Yurov Y.B.** Intercellular genomic variations manifesting as aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain. Human Genome Meeting - HGM2008, Hyderabad, India, 2008, 199.
- 120. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б.** Биоинформатика в клинико-лабораторной диагностике хромосомных аномалий: анализ геномных и эпигенетических баз данных. Клиническая Лабораторная Диагностика. 2008; 9:37-38.
- 121. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B.** High-resolution comparative genomic hybridization (HR CGH) as a powerful tool for molecular cytogenetic diagnosis. IV З'їзд Медичних Генетиків України, Львів, 2008, 68.
- 122. Юров И.Ю.** Новая биоинформатическая технология, основанная на изучении геномных и эпигенетических баз данных, для диагностики хромосомных аномалий у детей и анализа корреляций генотип-фенотип. Материалы седьмого Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2008, 95.
- 123. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б.** Современные биоинформатические технологии в педиатрии: внедрение анализа *in silico* в молекулярно-цитогенетическую диагностику геномных аномалий. Материалы XVI съезда педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии». 2009, 466.
- 124. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kolotii A.D. et al.** Chromosome instability at the subtissue level mediates neurodegeneration: a molecular neurocytogenetic study of the ataxia telangiectasia brain. Paediatr. Croat. 2009; 53(Suppl.2):29.
- 125. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Колотий А.Д. и др.** Анеуплоидизация клеток эмбрионального мозга как механизм патогенеза нервно-психических и онкологических болезней. Ультразвукова Перинатальна Діагностика, Харків - Одеса. 2009, 173-174.
- 126. Iourov I., Vorsanova S., Kolotii A. et al.** Mosaic expression of chromosome instability in the ataxia telangiectasia brain. Chromosome Res. 2009; 17(Suppl.1):S177-S178.
- 127. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T. et al.** Nonmalignant aneuploidization in the human brain: chromosome instability can mediate neurodegeneration in Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia. Eur. J. Hum. Genet. 2009; 17(Suppl.2):101.
- 128. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Лиер Т., Юров Ю.Б.** Интерфазные хромосомы клеток головного мозга в норме и при патологии. Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина — V Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Часть II. Москва. 2009, 137.
- 129. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Лиер Т., Юров Ю.Б.** Особенности организации интерфазных хромосом в клетках головного мозга человека. Материалы международной конференции «Хромосома 2009». Новосибирск. 2009, 7-8.
- 130. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Соловьев И.В., Юров Ю.Б.** Нестабильность хромосом в нервных клетках человека в норме и при психических заболеваниях. Материалы международной конференции «Хромосома 2009». Новосибирск. 2009, 74-75.
- 131. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б.** Внедрение новых диагностических технологий в педиатрическую практику: применение серийной сравнительной геномной гибридизации (array CGH). Материалы восьмого Российского конгресса: «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». 2009, 99.
- 132. Iourov I.Y.** Interphase cytogenetics: new developments in molecular cytogenetic diagnosis. BIT Life Sciences' Annual Congress and Expo of Molecular Diagnosis-2009, Beijing, China, 2009.P.51.