

ГЕНЕТИКА РЕПРОДУКЦИИ

Денисенко С.В., Дарий А.С.,
Кононенко М.И., Зерова-Любимова Т.Э.



Клиника проблем планирования семьи

Киев

2008

Клиника проблем планирования семьи

**Денисенко С.В., Дарий А.С., Кононенко М.И.,
Зерова-Любимова Т.Э.**

ГЕНЕТИКА РЕПРОДУКЦИИ

**Киев
2008 год**

УДК 612.6
ББК 28.04+52.5
Г34

Научный редактор *Т.И. Бужиевская, д. мед. н., профессор*

Рецензенты *Е.Я. Гречанина, д. мед. н., профессор, чл.-корр. АМНУ*
Л.Л. Лукаш, д. биол. н.
С.Г. Ворсанова, д. биол.н., профессор
Ю.Б. Юров, д. биол. н., профессор

Технический и литературный редактор *О.Б. Борисенко*

Г34 Денисенко С.В., Дарий А.С., Кононенко М.И., Зерова-Любимова Т.Э. ГЕНЕТИКА РЕПРОДУКЦИИ. – К.: Ферзь-ТА, 2008. – 652 с.

ISBN 978-966-8875-45-8

В руководстве обобщены современные достижения в области генетики и репродуктивной медицины. Представлен анализ собственного практического опыта работы в области вспомогательных репродуктивных технологий. Книга предназначена для врачей, биологов, студентов.

Руководство открывает серию публикаций, посвященных репродуктивной медицине.

ББК 28.04+52.5

ISBN 978-966-8875-45-8

© Денисенко С.В., Дарий А.С.,
Кононенко М.И., Зерова-Любимова Т.Э., 2008

*Посвящается сотрудникам
Клиники проблем планирования семьи,
навсегда изменившим лицо
отечественной репродуктологии*

"Считаю, что рецензированная монография является в определенной мере энциклопедией современных генетических знаний в области репродукции человека и позволит повысить уровень биологических и особенно генетических знаний репродуктологов"

Е.Я. Гречанина, профессор, член-корреспондент АМН Украины,
директор Украинского института клинической генетики ХГМУ,
директор Харьковского специализированного медико-генетического центра,
лауреат Государственной премии Украины в области науки и техники,
заслуженный деятель науки и техники Украины

"Это первая в Украине и, вероятно, в странах СНГ объемная работа в области генетики репродукции, в которой обобщены данные литературы и собственный лабораторный и клинический опыт авторов.

Очень основательно, детально, с учетом современных генетических достижений и методических возможностей изложены сведения по патофизиологическим механизмам и генетической природе нарушений репродуктивной функции у человека, разработке подходов и методов для их лечения.

Методы, подходы и опыт научных исследований, изложенные в книге, найдут широкое применение в решении практических задач центров вспомогательных репродуктивных технологий, в исследованиях стволовых клеток и разработке основ клеточной и генной терапии наследственных болезней"

Л.Л. Лукаш, доктор биологических наук,
заведующая отделом генетики человека
Института молекулярной биологии
и генетики НАН Украины

"В книгу включены достижения последних лет в области практической репродуктивной медицины и генетики, включая самые новейшие методы молекулярно-цитогенетической диагностики.... Собраны и систематизированы современные сведения о хромосомных синдромах и аномалиях, встречающихся в практике клинической генетики и наиболее часто приводящих к нарушению репродуктивной функции. Книга представляет большой интерес для широкого круга специалистов, работающих в области репродуктивной генетики и медицины, изучающих различные аспекты репродуктивной системы, и в первую очередь, для врачей-генетиков, эмбриологов, андрологов, а также практикующих врачей, студентов медицинского и биологического профиля"

Ю.Б. Юров, доктор биологических наук, профессор,
руководитель лабораторией цитогенетики
Научного центра психического здоровья
Российской Академии Медицинских наук,
главный редактор журнала "Молекулярная цитогенетика"
("Molecular Cytogenetics", BioMed Central and Springer Verlag)

"Книга является коллективным трудом авторов, обладающих научно-практическим опытом в области репродукции человека. В ней представлены основные проблемы, связанные с генетическими аспектами современной репродуктологии, без знания которых невозможно понять патологические механизмы, приводящие к бесплодию. Большой интерес представляет описание этих технологий и методов, а также проверенных практикой протоколов исследований и процедур. Особое внимание обращено на необходимость использования молекулярно-цитогенетической диагностики хромосомных аномалий, которая позволяет значительно повысить эффективность репродуктивных технологий. Книга содержит описания оригинальных случаев, в которых продемонстрированы показания к применению вспомогательных репродуктивных технологий, включая молекулярно-цитогенетическую диагностику. Книга хорошо иллюстрирована по представленным случаям, включая кариотипы больных"

С.Г. Ворсанова, доктор биологических наук, профессор,
руководитель лабораторией
молекулярной цитогенетики нервно-психических заболеваний
Московского НИИ педиатрии и детской хирургии Росмедтехнологий

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень сокращений	9
Глава 1. Основы генетики человека (<i>Кизилев Е.В.</i>)	11
1.1. Структура ДНК	13
1.2. Структура хромосом	20
1.3. Клеточный цикл, митотическое деление	22
1.4. Морфология митотических хромосом	25
1.5. Мейотическое деление	31
1.6. Гаметогенез	34
1.7. Оплодотворение	40
1.8. Мутации, типы мутаций	44
1.8.1. Геномные и хромосомные мутации	46
1.8.2. Диагностика хромосомных аномалий	58
1.8.3. Генные мутации	61
1.8.4. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания	71
1.9. Современные базы данных наследственных заболеваний	75
1.10. Геномный импринтинг	76
1.11. Идентификация генных мутаций	80
Литература	83
Глава 2. Патофизиологические механизмы и генетические аспекты нарушения репродуктивной функции у мужчины	91
2.1. Нарушения репродуктивной функции у человека	93
2.2. Этиологические факторы нарушения репродуктивной функции у мужчины	97
2.3. Оценка репродуктивной функции	103
2.4. Хромосомные мутации (численные и структурные аномалии хромосом) у мужчин с нарушением репродуктивной функции	112
2.5. Структура хромосомы Y и клинические аспекты генетических изменений в длинном плече хромосомы Y	128
2.6. Генетические аспекты детерминации пола и половой дифференцировки, нарушения этих процессов	139
2.7. Генетические аспекты нарушений гипоталамо-гипофизарно-гонадной регуляции репродуктивной системы у мужчин	158
2.8. Нарушения процесса выработки и функционирования сперматозоидов	191
Литература	195
Глава 3. Патофизиологические механизмы и генетические аспекты нарушения репродуктивной функции у женщины	237
3.1. Этиологические факторы нарушения репродуктивной функции у женщины	239
3.2. Оценка репродуктивной функции	249
3.3. Геномные и хромосомные мутации у женщин с нарушением репродуктивной функции	268

3.4. Структура хромосомы X и клинические аспекты генетических изменений хромосомы X	283
3.5. Хромосомные аномалии при невынашивании беременности	289
3.6. Методы анализа ооцитов и хромосомные aberrации в них	291
3.7. Генетические аспекты детерминации пола и половой дифференцировки, нарушения этих процессов	293
3.8. Генетические аспекты нарушений гипоталамо-гипофизарно-гонадной регуляции репродуктивной системы у женщин	309
3.9. Патогенетические варианты преждевременной недостаточности функции яичников	331
3.10. Генетические аспекты синдрома поликистозных яичников	335
3.11. Эндометриоз (эндометриоидный фактор бесплодия) и гены-кандидаты	340
Литература	343

Глава 4. Современные подходы к лечению нарушений репродуктивной функции у человека. Применение вспомогательных репродуктивных технологий

367	
4.1. Развитие современных методов лечения бесплодия	369
4.2. Внутриматочная инсеминация спермой супруга (донора)	379
4.3. Программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО и ЭКО с ICSI)	381
4.3.1. Применение естественных и стимулированных циклов в программах ЭКО и ЭКО с ICSI	384
4.3.2. Пункция фолликулов, получение и оценка ооцитов	397
4.3.3. Получение, обработка эякулята и оценка сперматозоидов. Инвазивные методы получения сперматозоидов и их незрелых форм	406
4.3.4. Оплодотворение <i>in vitro</i> : инсеминация ооцитов <i>in vitro</i> и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ICSI). Оценка эмбрионов . . .	429
4.3.5. Вспомогательные микроманипуляции с эмбрионами	443
4.3.6. Перенос эмбрионов в полость матки. Поддержка лютеиновой фазы	455
4.4. Программы ЭКО и ЭКО с ICSI с использованием донорских клеток, суррогатное материнство	457
4.5. Использование технологии криоконсервирования в практике ВРТ	459
4.6. Результативность вспомогательных репродуктивных технологий. Перспективы развития	463
Литература	471

Терминологический словарь

Литература	503
Литература	534

Приложение к главе I

Приложение к главе II

Приложение к главе III

Приложение к главе IV

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- АГ** антиген
- АКТГ** адренкортикотропный гормон
- АМГ** антимюллеров гормон
- а-ГнРГ** агонист ГнРГ
- ант-ГнРГ** антагонист ГнРГ
- АР** андрогенный рецептор
- АСАТ** антиспермальные антитела
- ВОЗ** Всемирная организация здравоохранения
- ВРТ** вспомогательные репродуктивные технологии
- ГнРГ** гонадотропин-рилизинг гормон
- ДГА** дегидроэпиандростендион
- ДГА-С** дегидроэпиандростендиона сульфат
- ДГЭА** дегидроэпиандростерон
- ДМСО** диметилсульфоксид
- ДНК** дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИФА** иммуноферментный анализ
- ИФР** инсулиноподобный фактор роста
- кДНК** комплементарная ДНК
- ЛГ** лютеинизирующий гормон
- МВПР** множественные врожденные пороки развития
- МII** метафаза II
- мтДНК** митохондриальная ДНК
- мРНК** матричная РНК
- ПГД** преимплантационная генетическая диагностика
- ПГС** преимплантационный генетический скрининг
- ПЦР** полимеразная цепная реакция
- рЛГ** рекомбинантный ЛГ
- РНК** рибонуклеиновая кислота
- рРНК** рибосомальная РНК
- рФСГ** рекомбинантный ФСГ
- рЧХГ** рекомбинантный хорионический гонадотропин человека
- СПКЯ** синдром поликистозных яичников
- СПМП** синдром персистенции мюллеровых протоков
- СЭФР** сосудисто-эндотелиальный фактор роста
- Т₃** трийодтиронин
- Т₄** тироксин
- ТРГ** тиротропин-рилизинг гормон
- тРНК** транспортная РНК
- ТТГ** тиротропный гормон
- ФСГ** фолликулостимулирующий гормон
- ХГ** хорионический гонадотропин
- цАМФ** циклический аденозинмонофосфат
- чМГ** человеческий менопаузальный гонадотропин
- чХГ** человеческий хорионический гонадотропин
- ЭКО** экстракорпоральное оплодотворение
- АН** assisted hatching вспомогательный хэтчинг
- ASRM** American Society of Reproductive Medicine Американское общество репродуктивной медицины
- AZF** azoospermia factor фактор азооспермии
- CAH** congenital adrenal hyperplasia врожденная гиперплазия коры надпочечников
- CAI** complete androgen insensitivity полная нечувствительность к андрогенам
- CASA** computer-aided sperm motion analysis компьютерная система анализа концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов
- CBAVD** congenital bilateral aplasia of vas deferens врожденное двустороннее отсутствие семявыносящего протока
- cenM-FISH** centromere-specific multiplex fluorescence in situ hybridization центромероспецифичная многоцветовая флюоресцентная in situ гибридизация
- CGH** comparative genome hybridization сравнительная геномная гибридизация
- CISS** chromosomal in situ suppression хромосомная супрессия in situ
- CMC** chemical mismatch cleavage метод химического расщепления некомплементарных сайтов
- CT** cytoplasmic transfer перенос цитоплазмы
- CV-CAH** simple-virilizing-CAH простая форма вирилизации при врожденной гиперплазии коры надпочечников
- CW-CAH** классическая сольтеряющая форма врожденной гиперплазии коры надпочечников
- DBD** DNA-binding domain ДНК-связывающий домен
- DFS** dysplasia of fibrous sheath дисплазия волокнистого слоя
- DGGE** denaturation gradient gel electrophoresis денатурирующий градиентный гель-электрофорез
- E₂** эстрадиол
- ELSI** elongated spermatid injection интрацитоплазматическая инъекция элонгированной сперматиды
- ESHRE** European Society of Human Reproduction and Embryology Европейское общество репродукции и эмбриологии человека
- FISH** fluorescent in situ hybridization флюоресцентная in situ гибридизация
- GBY** gonadoblastoma locus on the Y chromosome локус гонадобластомы на хромосоме Y
- GDF9** growth differentiation factor 9 фактор роста 9
- GIFT** gamete intrafallopian transfer перенос половых клеток в маточные трубы
- GV** germinal vesicle половой пузырек
- GVT** germinal vesicle transfer перенос ядра ооцита
- HA** heteroduplex analysis метод гетеродуплексного анализа
- ICS** immotile cilia syndrome синдром неподвижных ресничек
- ICSI** intracytoplasmic sperm injection интрацито-

плазматическая инъекция сперматозоида

ISH in situ hybridization гибридизация in situ

ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature Международная система номенклатуры хромосом человека

IUI intrauterine insemination внутриматочная инсеминация спермой супруга/донора

IVF in vitro fertilization оплодотворение in vitro

IVM in vitro maturation созревание in vitro

LBD ligand binding domain лиганд-связывающий домен

MAP mitogen-activated protein митоген-активирующий белок

MAR-тест mixed agglutination reaction тест, который определяет процент сперматозоидов, связанных с антителами классов IgG и IgA

MESA microsurgical epididymal sperm aspiration микрохирургическая аспирационная биопсия придатка яичка

mFISH multicolor fluorescence in situ hybridization многоцветовая флуоресцентная in situ гибридизация

MIM Mendelian inheritance in man Менделирующая наследственность человека

MPF metaphase-promoting factor фактор, способствующий образованию метафазы

MSY male specific region мужской специфический район

NRY nonrecombining region of the Y chromosome нерекombинирующий участок хромосомы Y

OASIS oocyte-activating substance in spermatozoan/spermatid ооцит-активирующая субстанция в сперматозоиде/сперматиде

PAI partial androgen insensitivity частичная нечувствительность к андрогенам

PAR pseudoautosomal region псевдоаутосомная область

PCD primary ciliary dyskinesia первичная цилиарная дискинезия

PCOS polycystic ovary syndrome синдром поликистозных яичников

PESA percutaneous epididymal sperm aspiration перкутанная аспирационная биопсия придатка яичка

PGD preimplantation genetic diagnosis преимплантационная генетическая диагностика

PHGPx phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase фосфолипид гидропероксидглутатионпероксидаза

PNT pronuclear transfer перенос пронуклеуса

POF premature ovarian failure преждевременная недостаточность функции яичников

PPSH pseudovaginal perineoscrotal hypospadias псевдовагинальная промежностно-мошоночная гипоспадия

PRINS primed in situ hybridization мечение хромосом с помощью полимеразной реакции с использованием специфических праймеров

PTT protein truncated test метод тестирования неполноценного белка

PVP polyvinyl pyrrolidone поливинилпирролидон

PZD partial zona dissection частичное рассечение зоны пеллюцида ооцита

ROS reactive oxygen species активные формы кислорода

ROSI round spermatid injection интрацитоплазматическая инъекция круглой сперматиды

ROSNI round spermatid nucleus injection интрацитоплазматическая инъекция ядра круглой сперматиды

SAP segmental aneuploidy profiling профилирование сегментной анеуплоидии

SCNT somatic cell nuclear transfer перенос ядра соматической клетки

SCSA sperm chromatin structure assay анализ структуры хроматина сперматозоидов

SESI secondary spermatocyte injection инъекция вторичного сперматоцита

SKY spectral karyotyping спектральное кариотипирование

SNP single nucleotide polymorphism единичные нуклеотидные полиморфизмы

SSCP single strand conformation polymorphism конформационный полиморфизм однонитевой ДНК

STR short tandem repeats короткие тандемные повторы

STS sequence-tagged sites нуклеотид-маркирующие сайты

SUZI subzonal insemination введение сперматозоида под зону пеллюцида ооцита

TAD terminal domain терминальный домен

TESA testicular sperm aspiration получение сперматозоидов с помощью аспирации из яичка

TESE testicular sperm extraction получение сперматозоидов с помощью открытой биопсии тестикулярной ткани

TET tubal embryo transfer интратубарный перенос эмбрионов

TFAM transcription factor A, mitochondrial митохондриальный транскрипционный фактор A

TGF transforming growth factor трансформирующий фактор роста

TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick мечение концов фрагментированных ДНК

UPD uniparental disomy однородительская дисомия

VNTR variable number tandem repeats вариабельность числа тандемных повторов

WHO World Health Organization Всемирная организация здравоохранения

XIC X inactivation center центр инактивации хромосомы X

ZIFT zygote intrafallopian transfer перенос зиготы в маточную трубу

γTuRC γ-tubulin ring complexes γ-тубулин комплексы

Глава I
Основы генетики человека

1.1. Структура ДНК

Молекулярной основой наследственности у всех прокариот и эукариот является особый класс биорганических веществ – нуклеиновые кислоты, которые подразделяются по химическому составу и биологической роли на дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК) кислоты (рис. 1.1). В клеточном ядре молекулы ДНК существуют в виде спирализованной двойной цепи, нити которой антипараллельны, т. е. имеют

противоположную ориентацию. У человека, как и у всех эукариот, большая часть наследственной информации содержится в ядерных структурах – хромосомах.

Внехромосомная часть генома человека, составляющая 0,0005%, представлена ДНК митохондрий. Оба типа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) представляют собой нитевидные молекулы, состоящие из отдельных

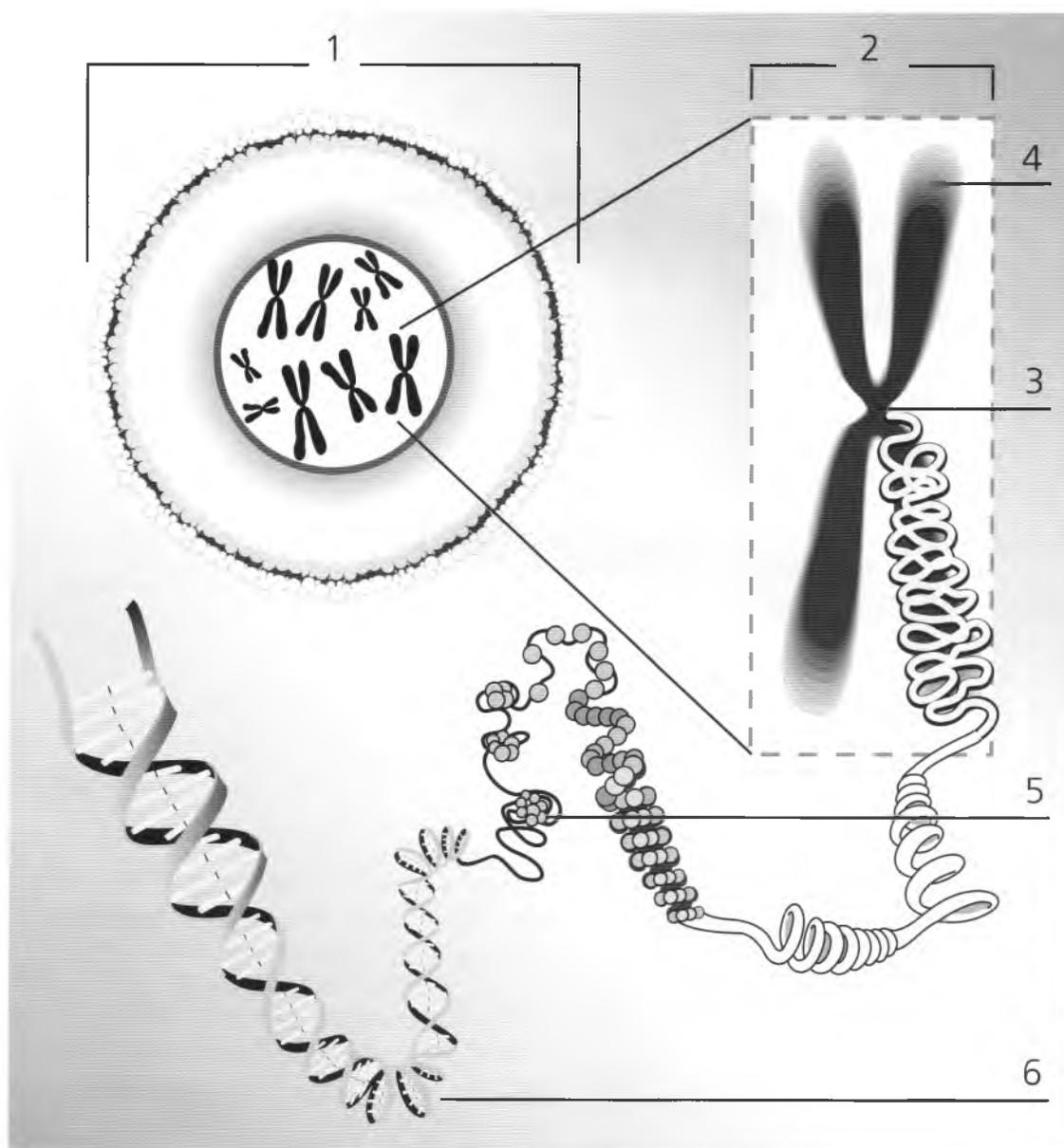


Рис. 1.1. Строение хромосомы: 1 – клетка; 2 – хромосома; 3 – центромера; 4 – теломера; 5 – гистоны; 6 – ДНК.

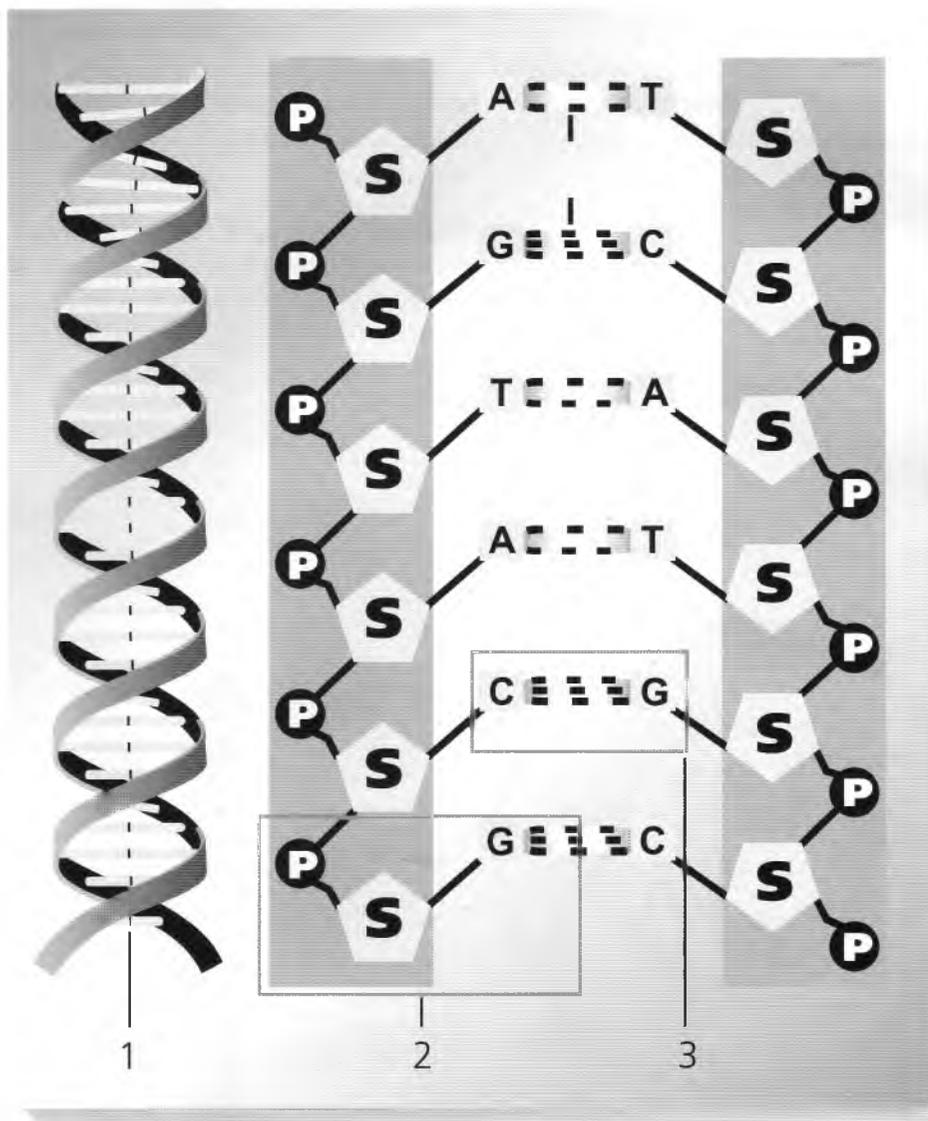


Рис. 1.2. Строение нуклеотида: 1 – ДНК; 2 – состав нуклеотида; 3 – пара оснований; А – аденин; G – гуанин; Т – тимин; С – цитозин; P – остатки фосфорной кислоты; S – моносахарид.

структурных единиц – нуклеотидов, соединенных в многозвеньевую полинуклеотидную цепь (рис. 1.2).

Каждый нуклеотид состоит из трех химически различных частей:

- азотистого основания (аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и тимин (T), в молекуле РНК вместо тимина – урацил (U));
- моносахарида – дезоксирибозы (в ДНК) и рибозы (в РНК), – который образует "остов" полинуклеотидной нити;
- остатка фосфорной кислоты.

В двухспиральной молекуле ДНК нуклеотиды соединяются водородными связями, образующимися между расположенными друг против друга азотистыми основаниями комплементарных цепей: аденин строго комплементарен тимину, а цитозин – гуанину.

При определенных условиях водородные связи могут разрываться, что приводит к появлению одноцепочечных молекул (денатурация ДНК), а в дальнейшем образовываться вновь между теми же комплементарными участками (ренатурация, или гибридизация ДНК). В процессе гибридизации

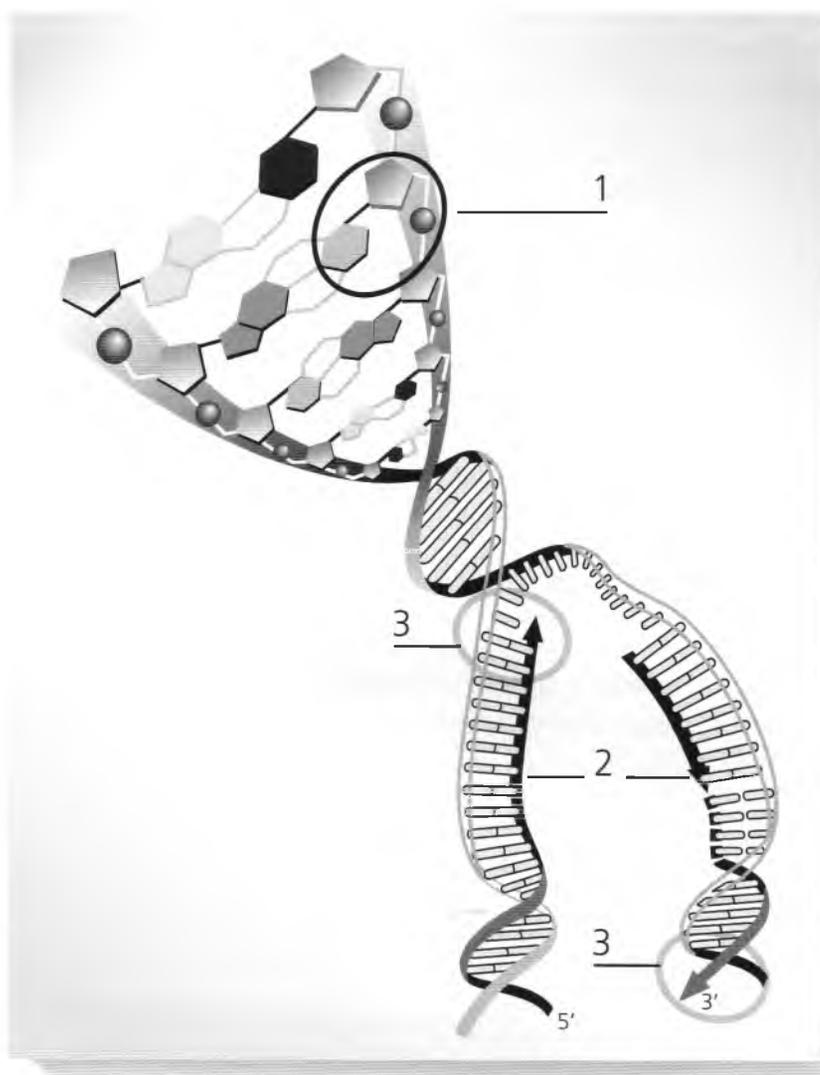


Рис. 1.3. Репликация ДНК: 1 – нуклеотид; 2 – новая цепь; 3 – ДНК-полимераза. Стрелками указано направление репликации от 5'– к 3'–концу.

происходит точное восстановление исходной двойной спирали ДНК. Именно свойство комплементарности обеспечивает как точность самовоспроизводства ДНК в каждом цикле клеточного деления (этот процесс носит название "репликация"), так и восстановление нарушенного нуклеотидного состава молекулы ДНК. Репликация генетической информации осуществляется линейно от 5'- к 3'-концу молекулы ДНК. Синтез молекулы ДНК в клетке реализует особый фермент – ДНК-полимераза. В ходе синтеза ДНК происходит расплетение двойной спирали на участке синтеза и об-

разование особой белково-нуклеиновой структуры – репликационной вилки.

Постепенное продвижение репликационной вилки вдоль двойной спирали сопровождается последовательным присоединением к вновь образуемой цепи оснований, которые комплементарны однонитевой ДНК-матрице (синтез растущей цепи ДНК всегда протекает строго в направлении от 5'- к 3'-концу) (**рис. 1.3**).

Комплементарный синтез ДНК требует присутствия в среде отдельных "кирпичиков" для удлинения растущей молекулы –

четырёх видов молекул дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Весь процесс инициируется особыми за-травками – праймерами, представляющими собой короткие олигонуклеотидные молекулы, комплементарные определённому стартовому участку ДНК-матрицы.

Длину молекулы ДНК обозначают парами нуклеотидов (п.н.). Поскольку в состав ДНК могут входить тысячи и миллионы пар нуклеотидов, используют термины килобазы (кб) и мегабазы (мб).

Структурно-функциональной единицей наследственности является ген, который представляет собой специфическая последовательность нуклеотидов в ДНК или РНК, детерминирующая нуклеотидную последовательность РНК (тРНК, рРНК) или последовательность аминокислот в белках. Ген занимает определённое положение в хромосоме. Совокупность генов, содержащихся в гаплоидном наборе хромосом, представляет в генетическом отношении единое целое и называется геномом организма. Размер генома человека составляет 3,3 млрд пар нуклеотидов. Генетическая информация зашифрована посредством универсального для всех живых организмов генетического кода, представляющего собой набор нуклеотидных триплетов – кодонов. Каждый такой триплет (т. е. каждая последовательность из трёх нуклеотидов), кроме трёх стоп-кодонов, кодирует в составе белка синтез одной, строго определённой аминокислоты. Генетическому коду присущи следующие свойства: считывание кодонов в процессе передачи генетической информации происходит последовательно (принцип линейности генетического кода), генетический код является вырожденным, т. е. допускает кодирование каждой из 20 аминокислот несколькими возможными комбинациями триплетов (всего таких комбинаций может быть 64).

Расшифровка точной последовательности нуклеотидов определённого информационного участка гена позволяет однозначно идентифицировать последовательность аминокислот в составе соответствующего полипептидного участка белка и устанавливать его размер. Полный гаплоидный геном человека (т. е. кодируемый одной смысловой нитью ДНК) включает около 30 000 генов.

Гены человека и других высших организмов имеют чрезвычайно сложную структурно-функциональную организацию и содержат различные по своей биологической роли участки. Одни из них – экзоны – относительно короткие, представляют собой кодирующие последовательности и определяют аминокислотный состав белков. Другие участки гена – интроны – обычно значительно более протяжённые. Прерывистость генов была установлена в 1977 г., было показано, что интроны не кодируют белок и при созревании молекулы РНК удаляются из предшественника РНК (**рис. 1.4**). Зрелая РНК содержит только экзоны. Роль интронов до настоящего времени окончательно не установлена; предполагается, что они могут иметь отношение к регуляции экспрессии генов и контролю тонких механизмов "считывания" генетической информации. В состав генов входят также особые регуляторные участки (промоторы, энхансеры, различные сигнальные последовательности), которые обеспечивают инициацию, интенсивность и определённую временную последовательность процессов нуклеотидного синтеза на ДНК-матрице, а также модификацию промежуточных полинуклеотидных продуктов.

Под экспрессией гена понимают реализацию записанной в нем генетической информации, обеспечивающей синтез первичных молекулярных продуктов гена – РНК. Именно временная и тканевая избирательность экспрессии генов определяет специфику дифференцировки и функционирования различных органов, тканей и клеток организма в онтогенезе.

Передача генетической информации в клетке основана на матричных процессах и состоит из нескольких этапов (**рис. 1.4**):

- Первый этап – транскрипция – считывание информации с нуклеотидной последовательности гена путем синтеза комплементарной ему молекулы РНК. Транскрипция осуществляется при помощи фермента РНК-полимеразы, которая "узнает" точку начала транскрипции, именуемую промотором, и присоединяется к нему, расплетая двойную спираль ДНК и копируя одну из них, что ведет к образованию в клеточном ядре молекул первичного РНК-транскрипта (преРНК). Молеку-

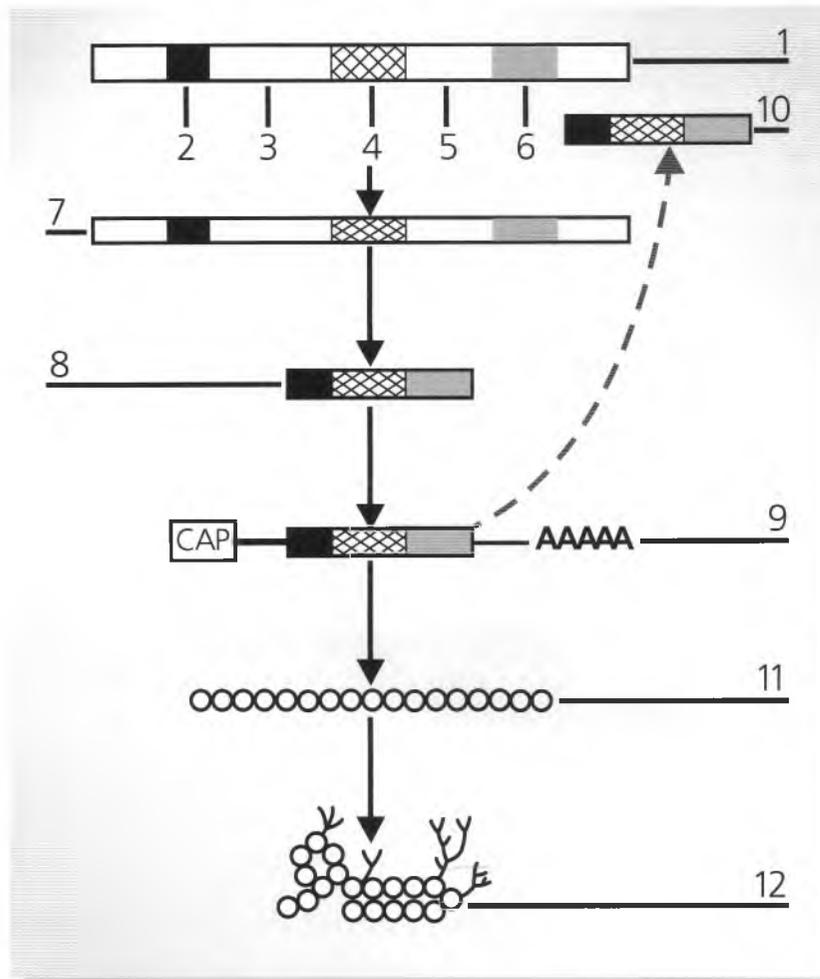


Рис. 1.4. Этапы передачи генетической информации в клетке:

1 – ген; 2, 4, 6 – экзоны; 3, 5 – интроны; 7 – первичный РНК-транскрипт;

8 – молекула РНК без интронов; 9 – зрелая мРНК; 10 – кДНК;

11 – первичная полипептидная молекула; 12 – белок.

Стрелками сверху вниз указаны следующие процессы: транскрипция, сплайсинг, концевые модификации, трансляция, созревание белка, обратная транскрипция (пунктирной линией).

ла преРНК представляет собой точный слепок ДНК-матрицы транскрибируемого гена.

- Второй этап – процессинг – стадия созревания (модификация концевых участков цепи синтезированной преРНК).

- Третий этап – сплайсинг – стадия "вырезания" интронов (удаление из первичного РНК-транскрипта некодирующих участков-интронов, в результате чего в составе РНК остаются лишь последовательно "сшитые" друг с другом смысловые участки, комплементарные экзонам гена. Ключевую сиг-

нальную роль в осуществлении сплайсинга играют определенные нуклеотидные последовательности, фланкирующие каждый из экзонов (так называемые сайты сплайсинга). В случае мутации в сайте сплайсинга происходит нарушение механизма удаления интронов из состава преРНК, что приводит к синтезу аномально по структуре пептида. Образующаяся после вырезания интронов зрелая РНК носит название матричной (мРНК), которая по своей длине во много раз короче транскри-

бируемого гена и его первичного РНК-транскрипта).

- Четвертый, заключительный этап – трансляция – стадия синтеза полипептидных цепей (процесс сборки молекул белка по матрице мРНК на рибосомах путем перевода информации с четырехбуквенного кода (по числу нуклеотидов) на 20-буквенный (по числу аминокислот). Этот этап передачи генетической информации происходит в цитоплазме.

Следует отметить, что наряду с последовательным вырезанием интронов, существует еще и альтернативный сплайсинг, в результате которого экзоны одного гена соединяются в разных комбинациях с образованием различных зрелых мРНК. Это явление в корне изменило представление о гене, как единице наследственности, кодирующей только одну полипептидную цепь (И.Ф. Жимулев, 2003).

Аминокислоты транспортируются к рибосомам с помощью транспортных РНК (тРНК), каждая из которых отвечает за перенос строго определенной аминокислоты. Такая специфичность определяется наличием в составе тРНК уникального нуклеотидного триплета, называемого антикодоном. По мере продвижения рибосомы вдоль молекулы мРНК антикодоны различных тРНК, несущих "свою" аминокислоту, последовательно распознаются комплементарными им кодонами мРНК, происходит последовательное присоединение "нужных" аминокислот к растущей полипептидной цепи.

Таким образом, процесс трансляции состоит из следующих этапов:

- процесса инициации – трансляция инициируется триплетом AUG, кодирующим аминокислоту метионин; метиониновый кодон открывает рамку считывания генетической информации (считывание происходит в соответствии с правилом "один триплет – одна аминокислота");
- реакции аминоацетилирования молекул тРНК;
- процесса элонгации полипептидных цепей;
- процесса терминации синтеза.

Сигналом окончания трансляции служит один из трех особых кодонов (UAA, UAG или

UGA), получивших название "стоп-кодона" (нонсенс-кодона); распознавание стоп-кодона на рибосоме прекращает синтез полипептидной цепи. По окончании трансляции первичная полипептидная молекула претерпевает определенные пост-трансляционные модификации, превращаясь в функционально зрелый продукт. "Дозревание" белка происходит, как правило, в соответствующих органеллах клетки. Помимо передачи наследственной информации от ДНК к РНК, существует другой путь, в обратном направлении – от молекулы РНК к молекуле ДНК (процесс обратной транскрипции). У высших организмов обратная транскрипция с мРНК на ДНК возможна в условиях *in vitro* с участием фермента обратной транскриптазы, в результате чего образуется искусственная молекула ДНК, полностью комплементарная мРНК-матрице, в которой отсутствуют интроны (комплементарная ДНК). Механизм обратной транскрипции учитывают при проведении различных молекулярно-генетических исследований для получения одноцепочечной молекулы ДНК (ДНК зонда), используемой в качестве молекулярного зонда, например, в преимплантационной, пренатальной и постнатальной диагностике наследственной патологии.

По выполняемым функциям гены подразделяют на три класса:

- структурные гены, которые транскрибируются в РНК, а затем транслируются на рибосомах в полипептидные цепи;
- структурные гены, которые транскрибируются в рРНК или тРНК и сами непосредственно используются;
- регуляторные гены, которые не транскрибируются, но служат сайтами узнавания для определенных ферментов при репликации и транскрипции ДНК.

Гены, вовлеченные в определенную функцию, часто располагаются один за другим, организованы в оперон и транскрибируются совместно на одну мРНК. Средний размер гена составляет 10-30 тыс п.н., варьируя от 21 п.н. до 2,2 млн п.н. Распределение генов на хромосомах очень неоднородно – они имеют тенденцию концентрироваться на концах хромосом, при этом наиболее богаты структурными генами хромосомы 19 и 22, а относительно бедны хромосомы 13, 18, 21 (McKusick, 2001). Пример

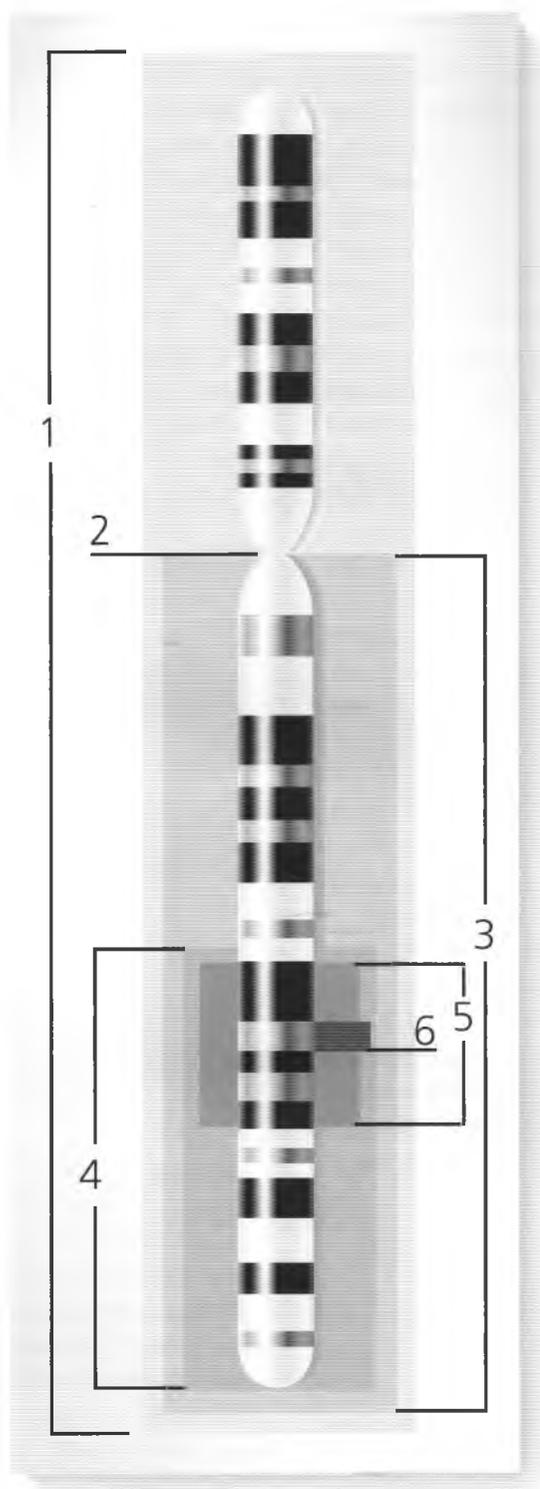


Рис. 1.5. Локализация гена *CFTR* на хромосоме 7 (7q31.2):
 1 – хромосома 7; 2 – центромера; 3 – длинное плечо q;
 4 – район 3; 5 – сегмент 1; 6 – подсегмент 2.

расположения гена на хромосоме представлен на **рис. 1.5.**

Поскольку большая часть ДНК находится в

ядрах клеток в виде хромосом, необходимо рассмотреть особенности упаковки, или укладки, ДНК в хромосомах.

1.2. Структура хромосом

В клеточном ядре нити ДНК совместно с белками образуют нуклеопротеидный комплекс, который называется хроматином. В нуклеопротеидном комплексе на долю ДНК приходится 40%, а на белки – 60%. Белки в составе хроматина очень разнообразны и делятся на две группы: гистоны (или основные белки, которые составляют большую часть в хроматине) и негистоновые белки. В состав гистонов входят пять классов различных белков: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Гистон Н1 состоит из 215 аминокислот, размеры других гистонов варьируют от 100 до 135 аминокислот. Гистоны Н2А, Н2В, Н3 и Н4 формируют нуклеосому, визуализируемую с помощью электронного микроскопа в виде бусины. Нуклеосома представляет собой гистоновый октамер, содержащий по две молекулы каждого из гистонов, кроме Н1. Каждая нуклеосома связана с нитью ДНК (145 п.н.), которая делает $1\frac{3}{4}$ оборота вокруг бусины. Нить ДНК между двумя нуклеосомами называется линкерной и содержит около 60 п.н. Взаимодействие гистонов с ДНК происходит за счет солевых или ионных связей. На гаплоидное количество ДНК человека приходится до $1,5 \cdot 10^7$ нуклеосом. Цепочка нуклеосом с нитью ДНК свернута в спираль диаметром 20-30 нм и образует хроматиновую фибриллу, в которой ДНК первично компактизирована – это так называемый первый, или нуклеосомный уровень компактизации хроматина (**рис. 1.6**).

Нуклеосомное строение хромосом сохраняется на всех этапах клеточного цикла и наблюдается по всей длине хромосомы. Следующий уровень компактизации происходит за счет участия гистонического белка Н1, который не входит в состав нуклеосомы, а своими аминными и карбоксильными окончаниями притягивает две соседние нуклеосомы, образуя фибриллу толщиной 25-30 нм. Сближаясь, нуклеосомы образуют нуклеомеры, или сверхбусины. Второй, нуклеомерный уровень компактизации нити ДНК обеспечивает 40-кратное уплотнение ДНК. В состав одного нуклеомера входит отрезок ДНК, содержащий 8 нуклеосом. Гистоновые белки обеспечивают как нуклеосомный, так и нуклеомерный уровни компактизации ДНК хроматина.

Дальнейший процесс компактизации ДНК, приводящий к плотноупакованной структуре митотической хромосомы, связан с укладкой 25-30 нанометровых фибрилл на новом уровне, где ведущую роль играют негистоновые белки. К негистоновым белкам относятся ферменты, принимающие участие в транскрипции, репликации и репарации ДНК. Компактизация нити ДНК происходит не за счет ее дополнительной спирализации, а с помощью образования поперечных петлистых структур, или хромомер. Третий уровень структурной компактизации хроматина – хромомерный – связан с образованием хромомер. В состав одного хромомера входят 60 000 п.н. длиной 0,2-0,3 мкм. В своих основаниях петли ДНК связаны негистоновыми белками ядерного матрикса.

Петлевые хромомеры, или домены, располагаются по длине хромосомы неравномерно, каждый хромомер состоит из нескольких петель, связанных в одном центре (**рис. 1.6**). Между собой хромомеры объединяются участками нуклеосомного хроматина. В среднем на хромосому приходится более 2000 петельных доменов ДНК.

Четвертый уровень компактизации – хромонемный. Сближенные в линейном порядке хромомеры образуют толстые (0,1-0,2 мкм) нити, которые подвергаются последующей спирализации (упаковке) с образованием конденсированных, плотноупакованных хромосом. Размещение и локализация хромомер строго специфичны для каждой хромосомы. Состояние максимально конденсированного хроматина приходится на время деления клеток, в ходе которого можно наблюдать с помощью светового микроскопа плотные тельца – хромосомы. Каждое клеточное деление завершается образованием двух дочерних клеток. Представление о циклических повторениях меняющихся состояний ядра в ряде последовательных клеточных делений (одно из исходных положений теории клеточного цикла) было сформулировано впервые В. Флеммингом в конце 70-х гг. XIX ст.

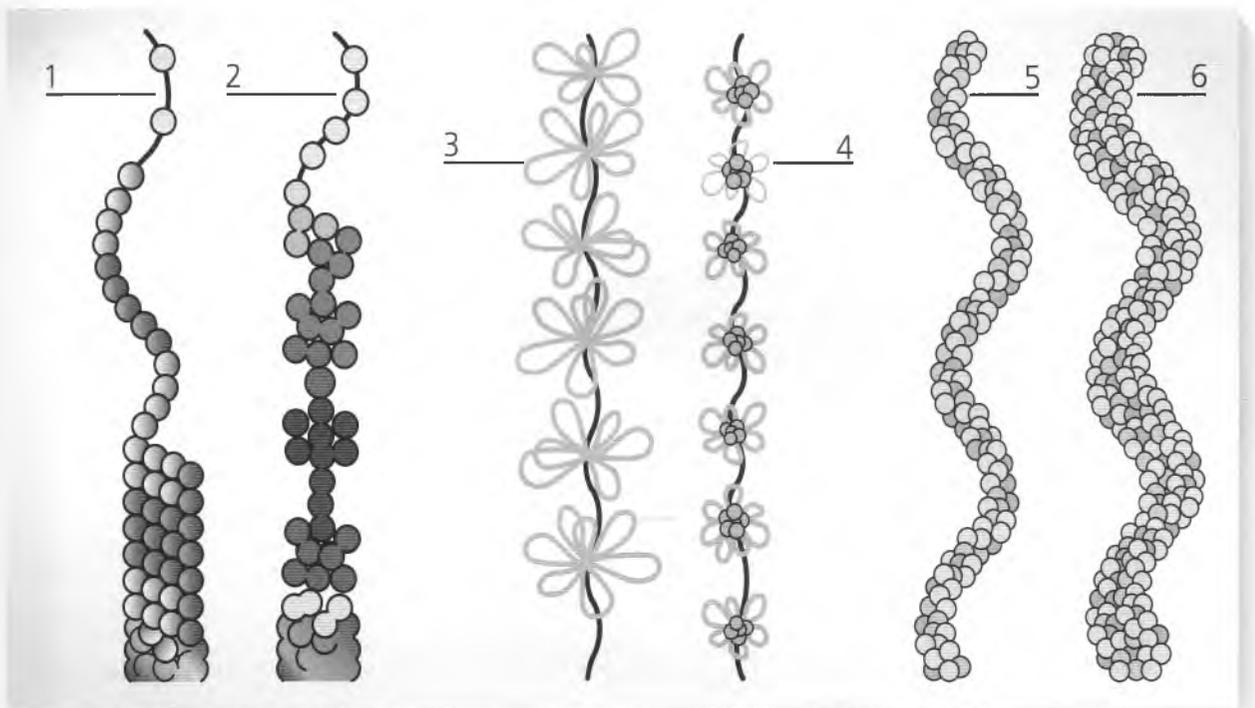


Рис. 1.6. Уровни компактизации хроматина (цит. по Ю.С.Ченцову, 1996):
 1 – нуклеосомный; 2 – нуклеомерный; 3 – образование хромомер;
 4 – образование петлевых доменов; 5 – хромонома; 6 – хроматида.

1.3. Клеточный цикл, митотическое деление

Согласно современным представлениям клеточный цикл – периодически повторяющаяся последовательная смена фаз (фаза деления – митоз, фаза между делениями – интерфаза) (рис. 1.7).

В зависимости от стадии клеточного цикла хромосомы могут находиться в двух альтернативных состояниях:

- максимально конденсированные, компактные, метаболически неактивные структуры; в этом состоянии они выполняют функцию пере-

носа наследственной информации дочерним клеткам (стадия митотического деления);

- деконденсированные, раскрученные, метаболически активные структуры, линейная длина которых увеличивается в десятки и сотни раз; в таком состоянии они выполняют функцию считывания и переноса наследственной информации с ДНК на РНК (стадия интерфазы).

Стадия интерфазы включает процессы транскрипции (период G_1 , который длится 9 ч),

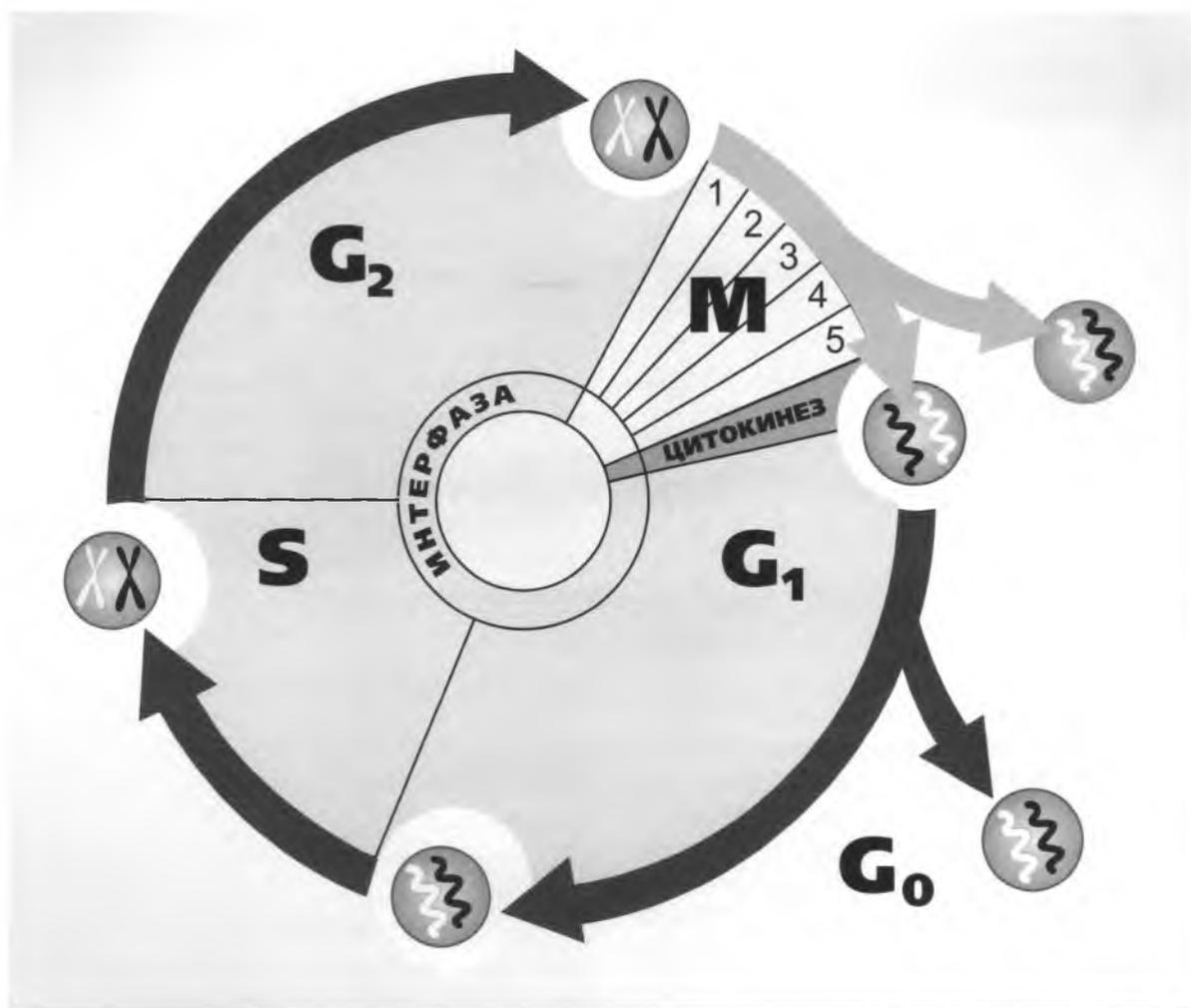


Рис. 1.7. Фазы клеточного цикла:

G_1 – рост клетки; S – период синтеза ДНК; G_2 – подготовка к митозу;

M – фаза митоза (профаза – 1, прометафаза – 2, метафаза – 3, анафаза – 4, телофаза – 5); G_0 – выход клетки из цикла.

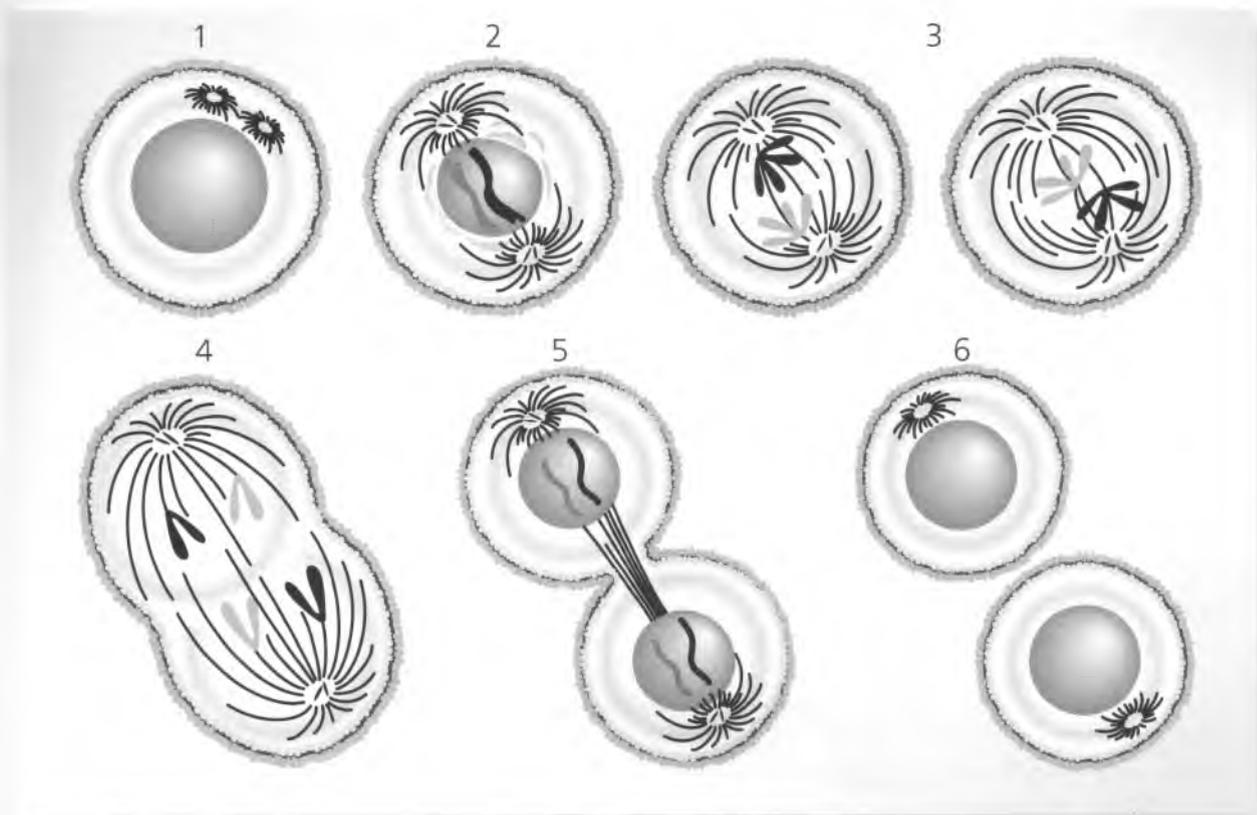


Рис. 1.8. Стадии митотического деления:

1 – интерфаза (период G_2); 2 – профаза; 3 – метафаза; 4 – анафаза;
5 – телофаза; 6 – цитокinesis (образование двух дочерних клеток).

репликации (во время периода синтеза S, который протекает 5 ч) и репарации ДНК (период G_2 длится 3 ч). Во время периода G_1 происходит реализация наследственной информации – процесс считывания информации с ДНК на РНК. В процессе репликации (S-период) из каждой молекулы ДНК образуются две дочерние, при этом различные участки ДНК реплицируются с разной скоростью (явление асинхронности). Синтез гистонов также происходит во время этого периода. Различают рано- и поздне-реплицированные районы, последние генетически менее активны: содержат меньшее количество уникальных последовательностей. Во время периода G_2 удвоенное количество ДНК достигает максимального уровня синтеза РНК и белка. Клетки готовятся к вступлению в митоз.

Стадия клеточного деления, или митотическое деление (митоз), – это такой тип деления клеток, при котором из одной диплоидной клетки образуются две диплоидные, генетически равнозначные клетки. Митоз продолжается 1 ч и состоит из четырех последовательных стадий: профаза, метафаза, анафаза и телофаза (**рис. 1.8**).

К концу профаза хромосомы становятся отчетливо видимыми, каждая из них состоит из двух хроматид. Центромера в каждой хромосоме удерживает две сестринские хроматиды, которые тесно прилегают друг к другу. Во время метафазы центромеры всех хромосом располагаются в экваториальной плоскости между двумя полюсами (**рис. 1.9а,б**). Хроматиды каждой хромосомы начинают отделяться одна от другой, оставаясь соединенными только в центромерной части, к

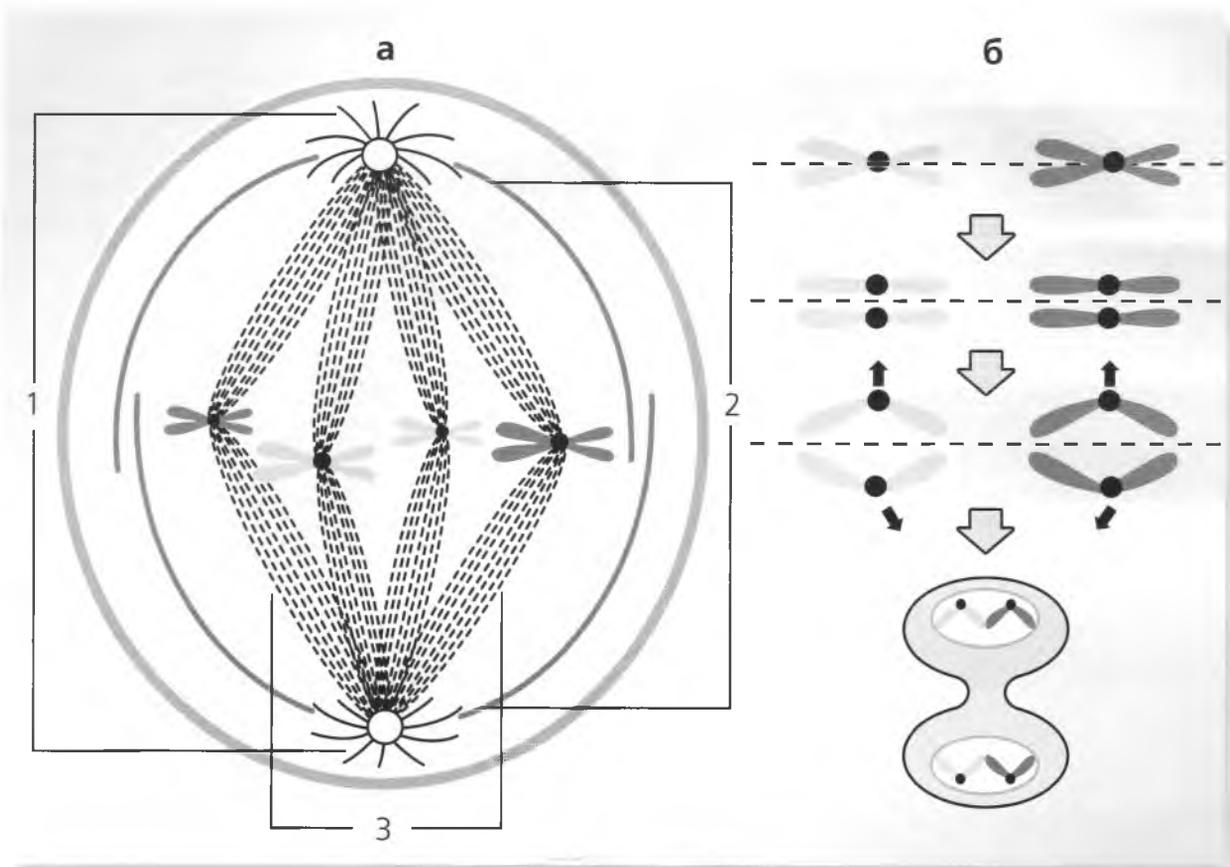


Рис. 1.9. Поведение хромосом на стадии метафазы во время митотического деления (а), расхождения хроматид (б).

Схема:

- 1 – астральные микротрубочки веретена деления;
- 2 – полюсные микротрубочки веретена деления;
- 3 – кинетохорные микротрубочки.

которой прикреплены микротрубочки веретена деления. Различают хромосомные микротрубочки, идущие от полюсов к центромерам хромосом, и центросомные, или полюсные, тянущиеся от полюса к полюсу (рис. 1.9а).

Анафаза начинается с одновременного разделения всех центромер и расхождения сестринских хроматид каждой хромосомы к противоположным полюсам. Утрата синхронности процесса может привести к неправильному расхождению хромосом. Центромеры с помощью веретена деления увлекают за собой дочерние хроматиды к противоположным полюсам. С прекращением движения хроматид заканчивается анафаза и начинается телофаза, которая связана с образованием ядерных

оболочек вокруг хромосом на двух полюсах клетки и началом деспирализации хромосом, углублением клеточной перетяжки. В конце телофазы дальнейшая перешнуровка цитоплазмы завершается формированием двух дочерних клеток. Результатом митоза является образование двух дочерних клеток с идентичным набором генетической информации. С помощью митотического деления поддерживается постоянство числа хромосом в ряду клеточных поколений.

1.4. Морфология митотических хромосом

Морфологию митотических хромосом изучают во время их максимальной конденсации на стадиях про- и метафазы с помощью микроскопической техники. Совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора, характерная для клеток представителя того или иного биологического вида, называется кариотипом. Термин был предложен в 1924 г. профессором ботаники Киевского университета Г.А. Левитским (Г.А. Левитский, 1924). Специфичность кариотипа определяется общим числом хромосом, их размером и формой, а числовая и структурная стабильность хромосом является важнейшим условием формирования фенотипически нормального организма в ходе индивидуального развития.

Соматические клетки человека содержат диплоидный набор хромосом (46 хромосом) – 22 пары аутосом и одну пару половых хромосом (XX или XY), тогда как половые клетки содержат гаплоидный набор хромосом (23, X в ооцитах и 23, X или 23, Y в сперматозоидах) (**фото 1.1а,б, 1.2**).

Каждая хромосома на стадии метафазы содержит две хроматиды, соединяющиеся в районе первичной перетяжки. В участке первичной перетяжки находится центромера, содержащая кинетохор, к которому прикрепляются микротрубочки веретена деления. Во время митотического деления микротрубочки задействованы в движении хромосом к полюсам клетки.

Центромерные районы каждой хромосомы содержат гетерохроматиновые блоки. Как известно, гетерохроматин представляет собой участки хромосом, в которых хроматиды упакованы в спираль, более плотную по сравнению с другими, эухроматиновыми районами хромосом. Гетерохроматиновые участки содержат в основном некодирующие высокоповторяющиеся последовательности ДНК, тогда как эухроматиновые участки хромосом содержат уникальные последовательности (во время интерфазы эухроматин деконденсирован). Для гетерохроматиновых участков характерны следующие признаки: плотная

упаковка хроматина, поздняя репликация ДНК, обусловленная недоступностью ДНК гетерохроматина сайт-специфическим рестрикционным ферментам; транскрипционная пассивность, а также подавление рекомбинации в мейозе. Гетерохроматин в области первичных перетяжек представлен альфоидной ДНК и "классической" сателлитной ДНК, содержащей участки повторяющихся последовательностей, с которыми взаимодействуют белки кинетохоров. "Классическая" сателлитная ДНК содержится в гетерохроматиновом участке хромосом 1, 9, 16, Y, а также в коротких плечах акроцентрических хромосом. Альфоидная ДНК содержится в центромерных участках всех хромосом.

Для хромосом характерно строго индивидуальное чередование гетерохроматиновых и эухроматиновых районов, которые визуализируются методами дифференциального окрашивания; наблюдается линейная неоднородность по длине – чередование темно- и светлоокрашенных полос, или сегментов (bands). Избирательное окрашивание и визуализация сегментов связаны с неравномерной локализацией гетерохроматина, ДНК которого обогащена А-Т парами оснований.

Плечи хромосом заканчиваются теломерами – концевые участки, ДНК которых содержит большое количество копий последовательности T₂AG₃. Длина теломерных участков колеблется от 2 до 20 тыс п.н., их функция заключается в защите ДНК от действия ферментов эндонуклеаз, предотвращении укорачивания хромосом в процессе репликации, обеспечении взаимодействия концов хромосом с внутриядерным матриксом, в поддержании целостности генома.

Морфологически митотические хромосомы представляют собой палочковидные структуры разной длины с первичной перетяжкой, которая делит хромосому на два плеча: короткое, обозначается символом "p" (petit), и длинное – "q" (queue). В зависимости от размещения центромеры различают такие хромосомы: метацентри-

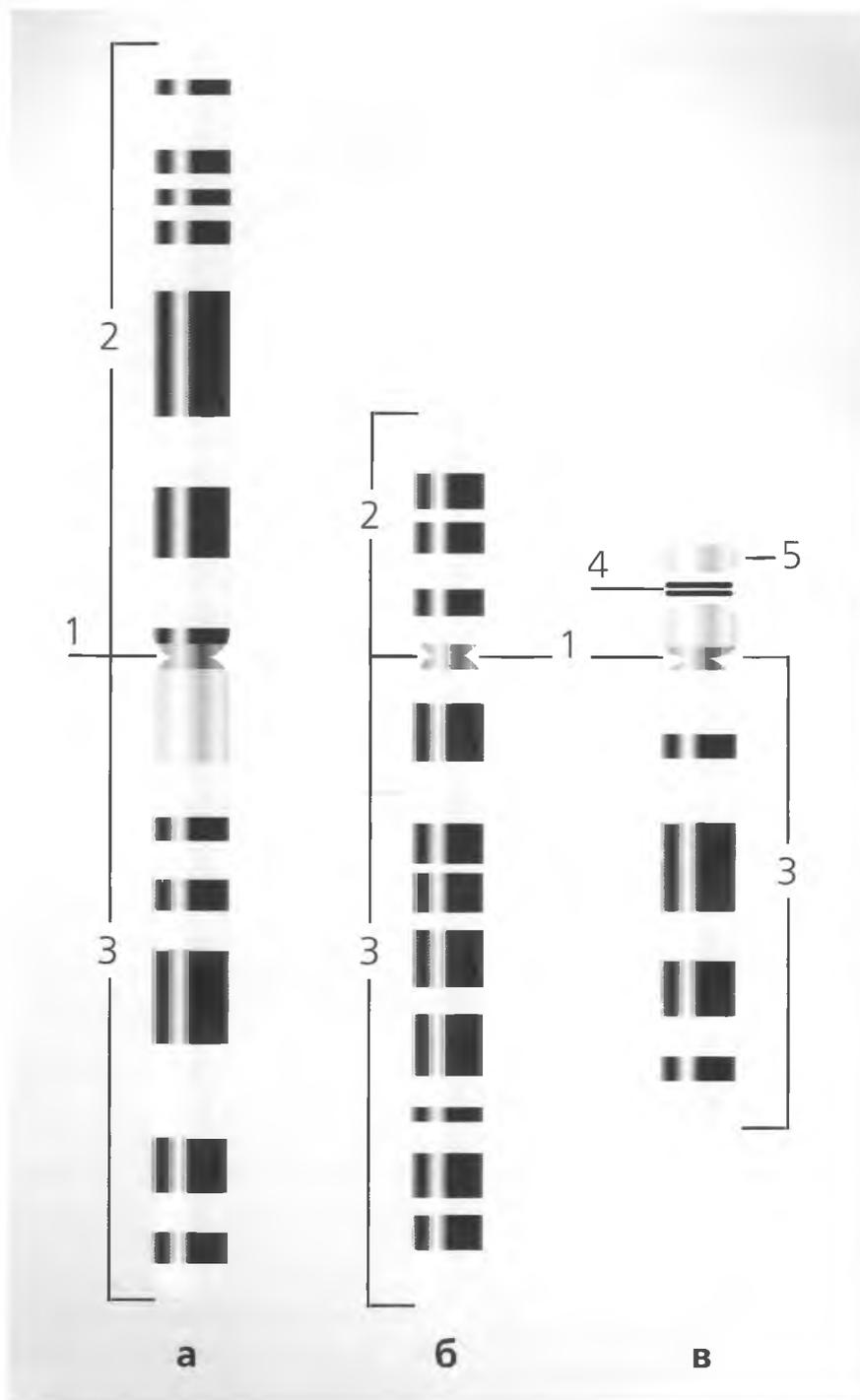


Рис. 1.10. Метацентрическая (а), субметацентрическая (б) и акроцентрическая (в) хромосомы человека.
Идиограмма: 1 – центромера; 2 – р-плечо; 3 – q-плечо;
4 – спутничные нити; 5 – спутники.

ческие (центромера расположена в середине хромосомы), субметацентрические (центромера смещена со срединного положения), и акроцентрические (центромера расположена ближе к концу хромосомы) (рис. 1.10).

Акроцентрические хромосомы отличаются от метацентрических и субметацентрических наличием в коротких р-плечах гетерохроматинового блока, вторичной перетяжки (спутничной нити) и спутников (рис. 1.10).

Согласно рекомендациям международных конференций (Денвер, 1960; Лондон, 1963; Чикаго, 1966) хромосомы пронумерованы от 1-й до 22-й пары (аутосомы) и размещены в порядке уменьшения их длины. Половые хромосомы, или гоносомы, обозначают латинскими буквами X и Y и в идиограмме размещают после последней аутосомы – хромосомы 22. Аутосомы, размещенные в таком порядке, подразделяют на семь групп, которые различают по длине и форме и обозначают большими буквами латинского алфавита от А до G (табл. 1.1).

Группа А (хромосомы 1-3) включает три пары самых длинных хромосом человека – две метацентрические и одну субметацентрическую с центромерным индексом около 40%. К группе В (хромосомы 4 и 5) относятся две пары длинных субметацентрических хромосом. Группа С (хромосомы 6-12) содержит семь пар субметацентрических хромосом с центромерным индексом 40-30%. К группе D (хромосомы

13-15) относятся три пары больших акроцентрических хромосом, к группе Е (хромосомы 16-18) принадлежат три пары субметацентрических хромосом. Группа F (хромосомы 19, 20) включает две пары маленьких метацентрических хромосом, к группе G (хромосомы 21, 22) относятся две пары маленьких акроцентрических хромосом со спутниками на коротких плечах. Короткие плечи всех акроцентрических хромосом (группы D и G) имеют ядрышковый организатор, который расположен в дистальной части хромосомы. В районе ядрышкового организатора локализована ДНК, ответственная за синтез рРНК.

Обозначение линейной структуры хромосом согласно Парижским рекомендациям по номенклатуре хромосом человека 1971 и 1981 гг. базируется на следующих принципах: каждая хромосома рассматривается как непрерывная совокупность темно- и светлоокрашенных сегментов; хромосомные плечи разделяются на районы (regions), которые разграничиваются специфическими маркерами (landmarks); районы в свою очередь разделяются на сегменты (bands) – участки хромосом, которые четко отличаются от соседних по интенсивности дифференциального окрашивания.

Районы и сегменты пронумерованы последовательно от центромеры к теломере. При фиксировании в записи кариотипа каких-либо структурных перестроек сначала указывают номер хромосомы, затем – символ плеча хромосомы (p или q), номер

Таблица 1.1. Характеристика аутосом согласно их классификации по группам

Группы	Хромосомы	Краткая характеристика хромосом
A	1–3	Самые крупные, 1 и 3 метацентрические, 2 субметацентрическая
B	4, 5	Крупные, субметацентрические, два плеча каждой из этих хромосом значительно отличаются по размеру
C	6–12	Среднего размера, субметацентрические
D	13–15	Среднего размера, акроцентрические, содержат спутники и спутничные нити
E	16–18	Мелкие, 16 метацентрическая, 17 и 18 субметацентрические
F	19, 20	Мелкие, метацентрические
G	21, 22	Мелкие, акроцентрические, содержат спутники и спутничные нити

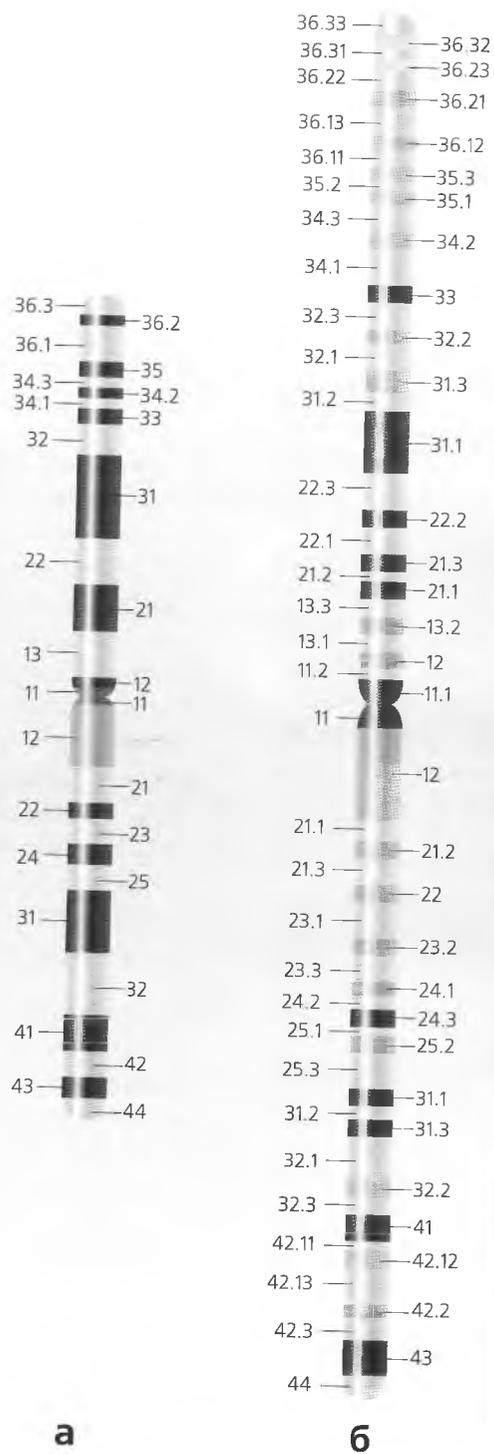


Рис. 1.11. Мета- (а) и прометафазная (б) хромосома 1. Идиограмма

района и номер сегмента. Анализ препаратов прометафазных хромосом позволяет визуализировать распределение сегмента на подсегменты, которые также указывают при записи кариотипа (рис. 1.11).

Для отдельных хромосом характерна индивидуальная изменчивость, на основе которой выделяют следующие группы:

- околоцентромерные районы аутосом 1, 9, 16 могут содержать различное количество гетерохроматина;

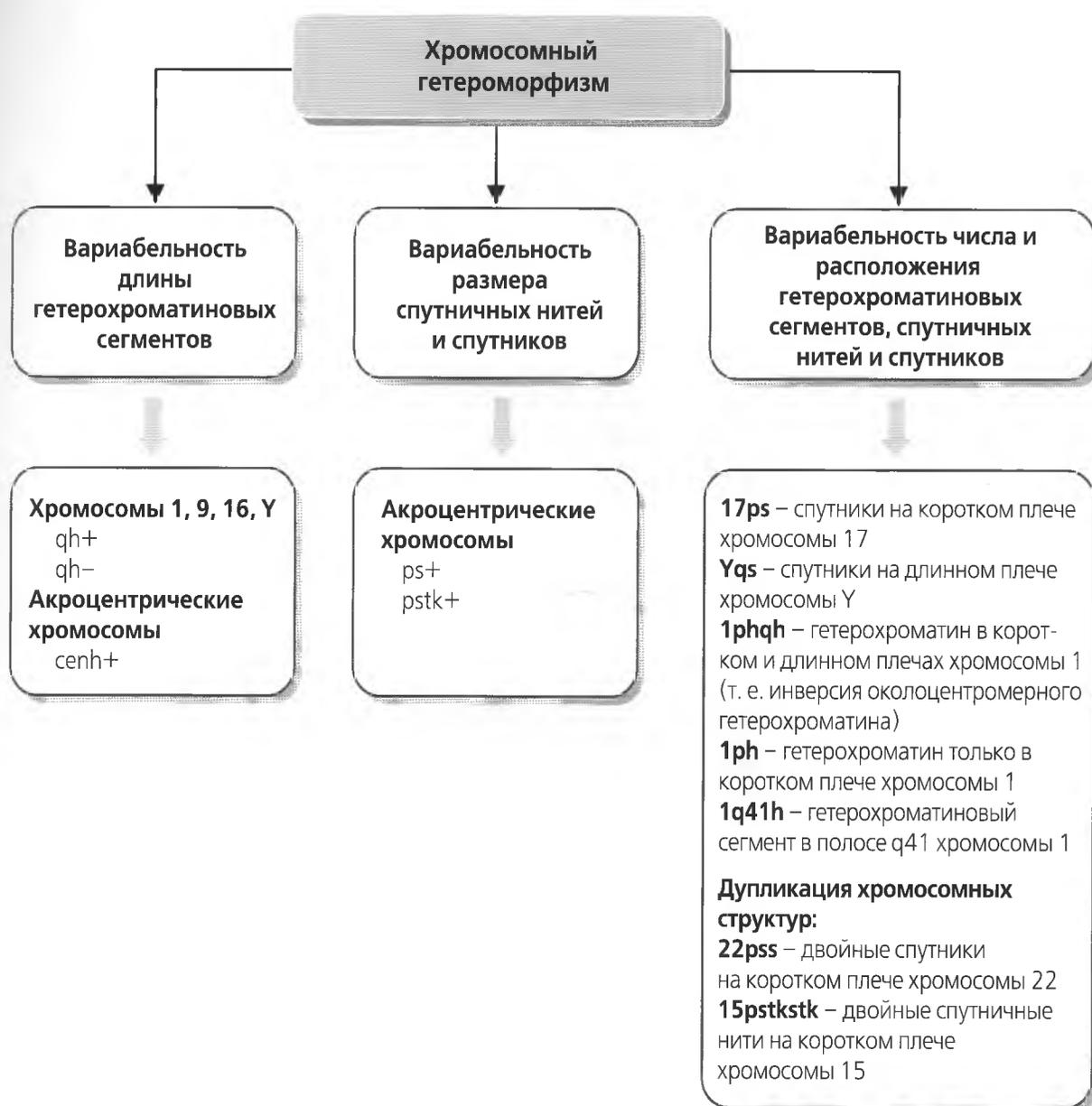


Рис. 1.12. Варианты нормальной изменчивости хромосом согласно ISCN, 2005

- короткие плечи акроцентрических хромосом могут варьировать по следующим показателям: длина спутничных нитей, размер спутников и длина (размер) центромерного гетерохроматина;
- хромосома Y в q-плече содержит варьирующий по размеру и длине гетерохроматиновый участок (**фото 1.3, 1.4**).

Некоторые хромосомы (за исключением акроцентрических) могут содержать вторичную перетяжку, которая является дополнительным морфологическим признаком хромосомы. Вторичная перетяжка образуется в результате неполной конденсации районов структурного гетерохроматина и наиболее часто наблюдается в околоцентромерных районах длинных плеч хромосом 1, 9, 16 (**фото 1.5**). Вторичная перетяжка в коротком плече хромосомы 17 визуализируется в виде спутников (**фото 1.6**).

Согласно международной системе номенклатуры в цитогенетике человека ("An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ICSN 2005") к гетероморфизму относятся также следующие перичентрические инверсии: хромосомы 1

(p13q21); хромосомы 2 (p11.2q13); хромосомы 3 (p11.2q12); хромосомы 9 (p12q13); хромосомы 10 (p11.2q21.2); хромосомы 16 (p11.2q12.1); хромосомы Y (p11.2q11.2). Ломкие (фрагильные) участки хромосом 6 (q13), 10 (q24), 16 (q22.1), 17 (p12), 22 (q13) рассматриваются также как вариант нормы (ISCN, 2005) (**фото 1.6, 1.7**). Варианты нормальной вариабельности хромосом представлены на **рис. 1.12**. Хромосомный гетероморфизм отмечают при стандартном цитогенетическом анализе соответствующими обозначениями.

Если для соматических клеток характерно только митотическое деление, то половым клеткам свойственны митотический и мейотический типы деления (процесс гаметогенеза).

1.5. Мейотическое деление

Мейотическое деление (мейоз) представляет собой особый способ деления клеток, в результате которого происходит редукция числа хромосом: из диплоидной клетки образуются гаплоидные – гаметы. При оплодотворении в результате слияния двух гаплоидных половых клеток (зрелого ооцита и сперматозоида) в зиготе восстанавливается диплоидное число хромосом, которое сохраняется во всех последующих митотических делениях.

Мейотический процесс обеспечивает уменьшение (редукцию) диплоидного числа хромосом наполовину до гаплоидного (23 хромосомы в клетке человека) и генетическую рекомбинацию с помощью случайного, независимого распределения гомологичных хромосом из разных пар, а также кроссинговера (обмена участками), происходящего во время конъюгации гомологичных хромосом. Общеизвестно, что генетическая рекомбинация является важным источником наследственной изменчивости. Благодаря независимому распределению гомологичных хромосом существует большое количество ($2^{23} = 8\,388\,608$) возможных вариантов комбинации хромосом в половых клетках. Вторым механизмом генетической рекомбинации проявляется при обмене гомологичными участками хромосом во время кроссинговера и формирования хиазм (рис. 1.13).

Мейоз состоит из длительной профазы и двух быстро следующих одно за другим делений, между которыми процесс репликации ДНК не происходит.

Рассмотрим детально стадии мейотического деления.

Профаза I. В профазе первого мейотического (или редукционного) деления в клетке содержится диплоидное число хромосом. Каждый этап профазы I условно выделен и обозначен.

Первая стадия – лептотена, во время которой становятся видимыми длинные хромосомные нити, формируются элементы синаптонемального комплекса. Во время зиготены происходит конъюгация (спарива-

ние) гомологичных хромосом и завершается формирование синаптонемального комплекса (образование бивалента). К моменту завершения конъюгации хромосомы укорачиваются и утолщаются (пахитена). В каждом биваленте появляется продольная щель, и визуализируются четыре хроматиды, которые образуют тетраду, состоящую из четырех хроматид двух конъюгирующих хромосом (диплотена). В то время как сестринские хроматиды остаются спаренными, несестринские разделяются. На этой стадии несестринские хроматиды соединяются между собой в некоторых точках, образуя фигуру, напоминающую греческую букву χ . Такие фигуры получили название хиазмы. В каждой паре конъюгирующих хромосом можно наблюдать несколько хиазм. Непосредственно перед метафазой I хромосомы еще больше укорачиваются и уплотняются – стадия диакинеза. Таким образом, наиболее важными событиями профазы первого деления мейоза являются синапсис и формирование синаптонемального комплекса, кроссинговер и формирование хиазм.

Метафаза I. Хромосомы располагаются в экваториальной плоскости, а их центромерные районы оттянуты к полюсам. Гомологичные хромосомы начинают разделяться, но еще удерживаются в районах хиазм.

Анафаза I. Начинается терминализация, или смещение, хиазм к терминальным участкам хромосом. Гомологичные хромосомы окончательно разделяются и перемещаются к противоположным полюсам, образуя дочерние ядра (интеркинез). В результате в телофазе у полюсов оказывается гаплоидное число хромосом, каждая из которых состоит из двух хроматид.

Между первым и вторым мейотическими делениями отсутствует стадия интерфазы, и хромосомы из телофазы I переходят в профазу II без деконденсации. Поскольку между первым и вторым делениями мейоза отсутствует процесс репликации, во втором мейотическом делении происходит разделение хроматид.

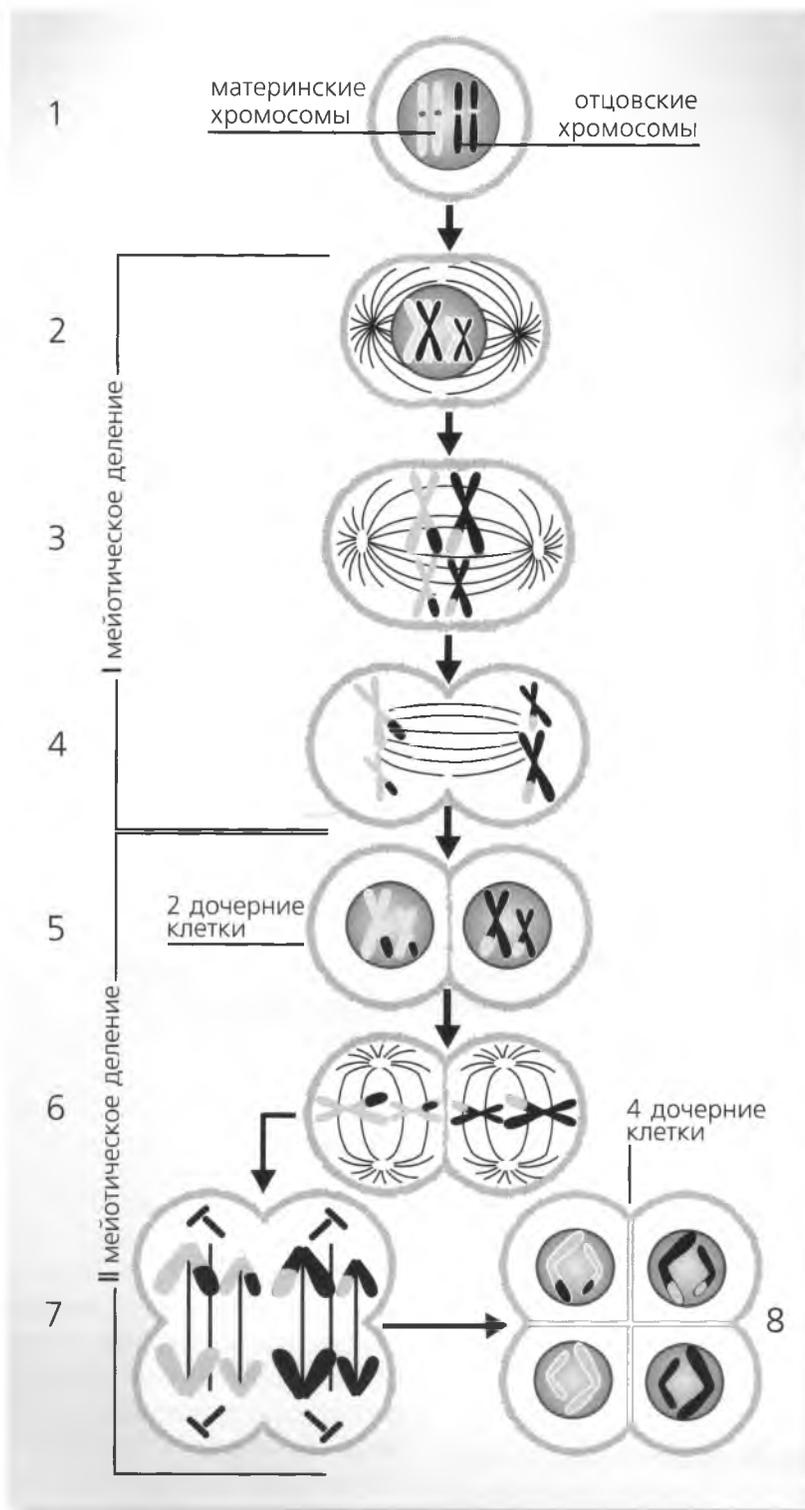


Рис. 1.13. Характеристика стадий первого и второго мейотического деления:
1 – родительская клетка; 2 – профаза I; 3 – метафаза I; 4 – анафаза I;
5 – телофаза I; 6 – метафаза II; 7 – анафаза II; 8 – телофаза II.

Второе мейотическое (или эквационное) деление является по сути митотическим делением удвоенного гаплоидного набора хромосом: состоящие из сестринских хроматид 23 хромосомы, соединенные в центромерных участках, двигаются к экваториальной плоскости. В анафазе II и телофазе II сестринские хроматиды расходятся к противоположным полюсам. Сравнение митотического и мейотического типов деления представлено в **табл. 1.2**.

Таким образом, в результате мейотического деления из одной исходной клетки образуются четыре клетки с уменьшенным вдвое количеством хромосом. Процесс образования и развития зрелых половых клеток (гамет) носит название "гаметогенез". Оогенезом называют процесс образования и развития женских половых клеток, сперматогенезом – мужских.

Таблица 1.2. Сравнительная характеристика митотического и мейотического типов деления клеток

Особенности	Митоз	Мейоз
Локализация	Все соматические клетки	Только в яичках и яичниках
Продукты	Соматические клетки с диплоидным набором хромосом	Половые клетки с гаплоидным набором хромосом
Репликация ДНК и деление клеток	В норме один период репликации на клеточное деление	Только один период репликации, но два клеточных деления
Конъюгация гомологов	Отсутствует	Присутствует (во время первого мейотического деления)
Рекомбинация	Редкая и аномальная	В норме по меньшей мере одна в каждом плече хромосомы
Взаимосвязь между дочерними клетками	Генетически идентичны	Генетически неидентичны в результате рекомбинации и независимого распределения гомологичных хромосом

1.6. Гаметогенез

Первичные половые клетки, или гоноциты, круглой формы, диаметром 15-20 мкм, содержат эксцентрическое ядро с ярко выраженным гранулярным хроматином и одним или двумя ядрышками. Морфологически первичные половые клетки идентифицируются у 15-20-дневных эмбрионов. На 27-й день после оплодотворения гоноциты обособляются от других соматических клеток эмбриона на задней стенке первичной кишки, мигрируют в область зачатка половых желез, которые формируются на вентральной стороне мезонефроса. Поскольку половые клетки происходят от гонадальных стволовых клеток с диплоидным набором хромосом, в процессе гаметогенеза в результате мейотического де-

ления количество хромосом уменьшается до гаплоидного – зрелые половые клетки содержат гаплоидный набор хромосом.

Оогенез – совокупность последовательных процессов развития женских половых клеток путем дифференцировки первичных женских половых клеток, в результате чего образуются зрелые ооциты. Процесс оогенеза включает периоды размножения, роста, созревания женских половых клеток (рис. 1.14).

Во время периода размножения первичные половые клетки митотически делятся и превращаются в оогонии (с диплоидным набором хромосом), характеризующиеся большим, расположенным в центре ядром и

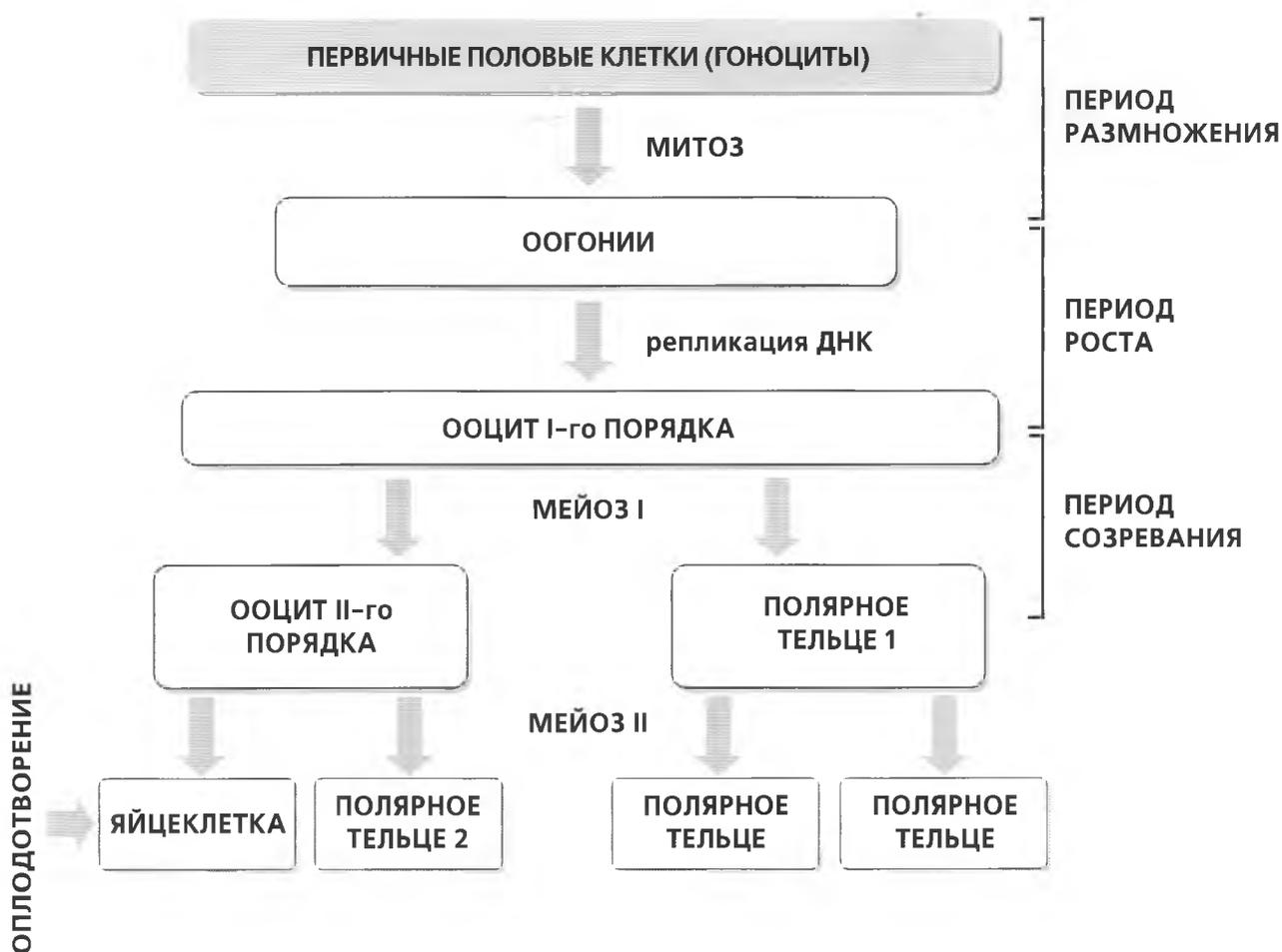


Рис. 1.14. Этапы оогенеза. Схема



Рис. 1.15. Количество женских половых клеток во время оогенеза во внутриутробном развитии и после рождения

высокой митотической активностью. В развивающемся яичнике первичные половые клетки окружены тонким слоем эпителиальных клеток. Количество оогоний достигает своего пика на 5-й месяц внутриутробного развития (6-7 млн), однако большинство первичных половых клеток погибает еще в пренатальном периоде развития организма. При рождении девочки их число составляет примерно 2 млн в обоих яичниках. К моменту полового созревания большинство первичных половых клеток дегенерирует. Число ооцитов, которые достигают зрелости и овулируют на протяжении репродуктивного периода женщины, составляет 300-450 (рис. 1.15).

В конце третьего месяца внутриутробного развития девочки наступает следующий этап оогенеза – период роста, во время которого оогонии, находящиеся в фолликуле, начинают активно расти и дифференцироваться, каждый оогоний превращается в

ооцит первого порядка. Клетки, окружающие ооцит первого порядка, называются фолликулярными. Ооциты первого порядка вступают в профазу первого деления мейоза, но не завершают его. В начале периода роста или в фазе медленного роста (превителлогенез) ооцит незначительно увеличивается в размере, в ядре происходят конъюгация гомологичных хромосом и кроссинговер. Стадии лептотены и зиготены приходятся на период между 2-м и 7-м месяцами внутриутробного развития. На стадии диктиотены мейотическое деление останавливается на долгие годы. К моменту рождения у девочки ооциты первого порядка остаются на стадии диплотены–диктиотены и заключены в фолликулы. К моменту начала полового созревания каждый из нескольких тысяч первичных фолликулов, расположенных в корковом веществе яичника, состоит из ооцита первого порядка диаметром 25-30 мкм, окруженного одним слоем фолликулярных клеток. Ядро ооцита первого порядка оста-

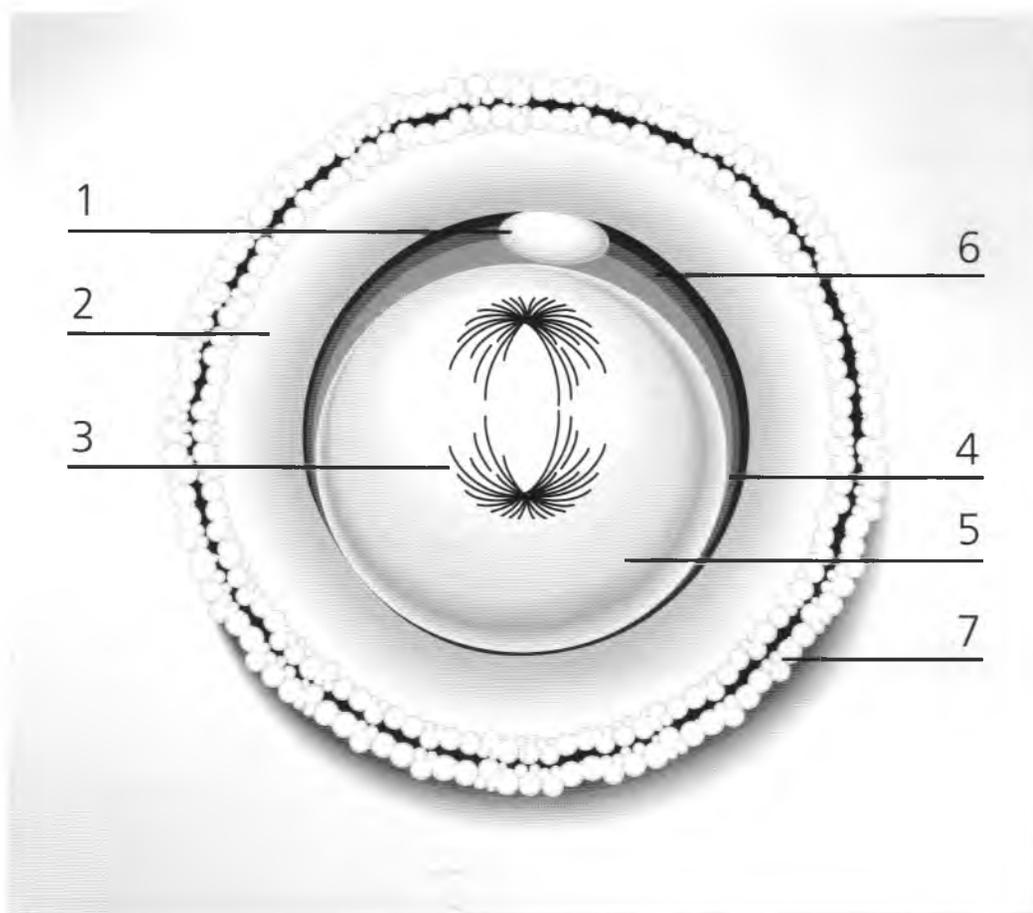


Рис. 1.16. Зрелый ооцит: 1 – полярное тельце;
2 – зона пеллюцида; 3 – веретено деления;
4 – плазматическая мембрана; 5 – ооплазма;
6 – перивителлиновое пространство; 7 – кумулюс.

ется в профазе первого деления мейоза, хромосомы деспирализованы. В таком состоянии они пребывают длительное время, пока спустя годы не завершится мейоз. После рождения все стволовые клетки утилизируются – оогонии превращаются в ооциты или дегенерируют. Деление клеток завершается только после наступления половой зрелости. С этого момента примерно каждые 28 дней у половозрелой небеременной женщины в яичнике развивается один из фолликулов, который увеличивается в размере и приближается к поверхности яичника. Во время роста фолликула ооцит проходит период созревания: клетка увеличивается в размере в два раза, образуется зона пеллюцида. Процесс высвобождения и выхода зрелого ооцита из яичника называется овуляцией. В момент разрыва фолликула находящийся в нем зрелый ооцит (ооцит второго

порядка) окружен фолликулярными клетками, которые формируют лучистый венец. Процесс овуляции предваряет быстрое завершение первого мейотического деления в ооците первого порядка, в результате которого образуются две гаплоидные клетки. Распределение цитоплазмы во время деления происходит неравномерно: одна из дочерних клеток – ооцит второго порядка – получает почти всю цитоплазму материнской клетки, тогда как вторая, образовавшаяся после деления клетка (первое полярное тельце), практически не содержит цитоплазмы (**рис. 1.16**).

Ооцит второго порядка вступает во второе мейотическое деление, которое останавливается на стадии метафазы до момента, пока не произойдет оплодотворение. Мейотическое деление завершается только после



Рис. 1.17. Этапы сперматогенеза. Схема

оплодотворения, образуются яйцеклетка и второе полярное тельце. Оба полярных тельца впоследствии дегенерируют. Ооцит второго порядка имеет гаплоидный набор хромосом. Такой же набор хромосом имеют первое и второе полярные тельца. Образование половых клеток у женщин начинается до момента рождения, после рождения ооциты первого порядка долгие годы находятся на стадии профазы I. В ходе оогенеза из одного диплоидного ооцита первого порядка образуется один зрелый ооцит, т. е. только одна из четырех клеток, образовавшихся в процессе мейоза, развивается в зрелый ооцит, три другие формируют полярные тельца, которые дегенерируют.

Сперматогенез представляет собой сложный многоэтапный процесс, включающий ряд последовательных событий во время митотического деления (этап пролиферации), мейотического деления и процесса спермиогенеза (этап дифференциации клеток), в результате которых из сперматогониальных стволовых клеток образуются сперматозоиды (рис. 1.17 и 1.18).

Процесс сперматогенеза осуществляется в извитых семенных канальцах яичек: продукты сперматогенеза из извитых канальцев яичек поступают в семявыносящий проток, а оттуда – в семявыбрасывающий проток. Эпителий зрелого семенного канальца состоит примерно из шести слоев клеток. Наружный слой – клетки зачаточного эпителия, делящиеся митотически. Стволовые клетки называются сперматогониями. Известны четыре типа сперматогониальных клеток у человека (A_{long} , A_{dark} , A_{pale} , B). До половой зрелости первичные половые клетки семенных канальцев пополняются A_d -сперматогониями (dark – темный), которые проходят непрерывную цепь митотических делений. Из двух продуктов деления одна клетка готовится к следующему делению на A_d -клетки, тогда как другая делится, образуя две A_p -клетки (pale – бледный). Цикл деления A_d -сперматогониев длится около 16 дней. Митотически активная популяция сперматогониев получила название A_p , менее активная – A_d . После серии митотических делений недифференцированные A_p -сперматогонии становятся A_1 , A_2 , A_3 , A_4 -умеренными и, в конце кон-

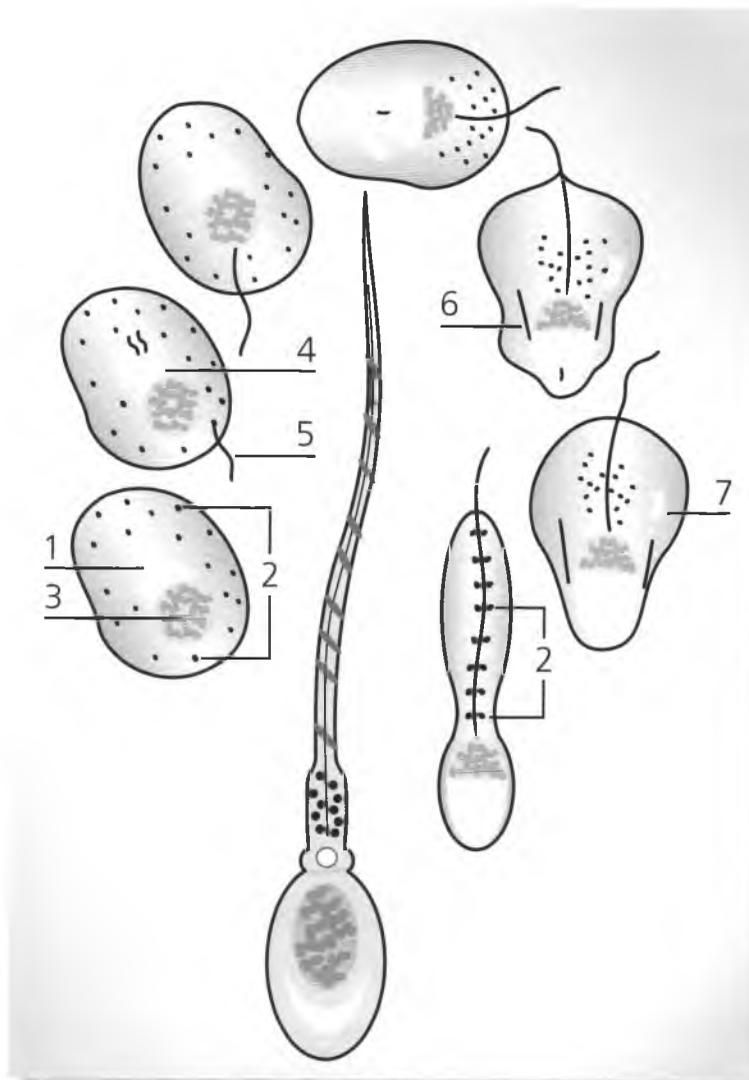


Рис. 1.18. Созревание сперматозоида, его строение (цит. по С. Гилберту, 1993):

- 1 – аппарат Гольджи; 2 – митохондрии; 3 – ядро;
 4 – акросомный пузырек; 5 – жгутик; 6 – микротрубочки;
 7 – остатки аппарата Гольджи.

цов, дифференцированными В-сперматогониями, митотическое деление которых приводит к формированию сперматоцитов 1-го порядка. Этот митотический этап является отправной точкой мейотического деления. Каждый этап клеточного деления сопровождается перемещением клеток из наружного слоя во внутренний. Клетки, образовавшиеся в результате митотического деления, перемещаются внутрь канальца, формируя второй слой. Клетки второго слоя – сперматогонии – также подвергаются митотическому делению. Перемещение сперматогониев в третий слой связано с началом фазы роста и их превращением в более крупные клетки – сперматоциты 1-го порядка. В третьем слое с момента начала полового созревания про-

исходит первое мейотическое деление, и из каждого сперматоцита 1-го порядка образуются две клетки с гаплоидным набором – сперматоциты 2-го порядка. Каждый сперматоцит второго порядка проходит второе мейотическое деление и дает начало двум сперматидам с гаплоидным набором хромосом. Процесс превращения сперматиды в сперматозоид называют спермиогенезом. Превращение сперматид в сперматозоиды происходит во внутренних слоях семенного канальца – вблизи его просвета. Эти вначале небольшие округлые клетки со сферическим ядром становятся удлинёнными, их ядра располагаются у проксимального конца клетки.

В каждой сперматиде одна из двух центрио-

лей, расположенных вблизи закругленного конца ядра, формирует жгутик. Первый признак превращения сперматиды в сперматозоид – появление плотной акросомной гранулы на поверхности ядерной оболочки. Растущая акросомная гранула дифференцируется на две части: акросому – небольшое полушарие у переднего конца ядра и шапочку – мембраноподобную структуру, распространяющуюся вокруг акросомы и по поверхности ядерной оболочки. Таким образом, спермиогенез приводит к элонгированию сперматиды, развитию акросомы, конденсации хроматина в ядре, уменьшению объема цитоплазмы, формированию средней части и жгутика сперматозоида. На конечном этапе спермиогенеза избыток цитоплазмы отбрасывается клеткой в виде остаточного тельца, которое захватывается клетками Сертоли, а зрелые сперматиды, теперь называемые тестикулярными сперматозоидами, попадают в полость канальца.

В результате сперматогенеза из одного диплоидного сперматоцита первого порядка образуются четыре зрелых сперматозоида. Полный цикл сперматогенеза составляет примерно 74 дня.

Между оогенезом и сперматогенезом существует ряд различий по временным показателям, продолжительности отдельных этапов, а также по характеру таких биологических процессов, как конъюгация и сегрегация хромосом (табл. 1.3).

Существующие различия в клеточной кинетике, по-видимому, обуславливают разницу между женщинами и мужчинами в частоте возникновения анеуплоидии хромосом (большинство случаев имеют материнское происхождение), с одной стороны, и точковых мутаций – с другой. Таким образом, мейотическое деление в женской половой клетке завершается только после оплодотворения. Вокруг женских и мужских гаплоидных наборов хромосом образуется ядерная мембрана, зигота содержит два пронуклеуса. Эта стадия особенно чувствительна к нарушениям, вызванным, например, мутагенными факторами. Несколько часов спустя два пронуклеуса сливаются, образуя диплоидное ядро, и зигота начинает делиться путем митоза.

Таблица 1.3. Сравнительная характеристика мейотического процесса в женском и мужском организмах

Мужчина	Женщина
Мейоз начинается после полового созревания, приводит к ежедневному продуцированию примерно 200–300 млн сперматозоидов. Весь цикл сперматогенеза продолжается примерно 120 дней, 72–74 из них занимает мейоз	Мейоз начинается во внутриутробном возрасте у плода женского пола, лишь небольшое количество ооцитов достигает финальных стадий деления, большинство из них утилизируются до рождения
Каждая родительская клетка дает начало четырем гаметам (сперматозоидам), все деления равны	Два неравных клеточных деления: большая часть цитоплазмы сохраняется в ооците, меньшая образует первое и второе полярные тельца, таким образом, каждая родительская клетка образует лишь одну гамету
Яички содержат популяцию стволовых половых клеток	Количество ооцитов ограничивается лишь присутствующими при рождении, примерно 350 из них овулируют в интервале между половым созреванием и менопаузой
Инициация синапсиса в терминальных участках хромосом	Инициация синапсиса преимущественно в интерстициальных участках хромосом
Синаптонемальные комплексы конденсированы	Синаптонемальные комплексы относительно деконденсированы, их протяженность почти в два раза больше на клетку по сравнению с мужскими половыми клетками
Расположение хиазм в терминальных участках	Предпочтительное расположение хиазм в интерстициальных участках

1.7. Оплодотворение

При естественном зачатии сперматозоиды в женском репродуктивном тракте наиболее фертильны на протяжении 12-24 ч, сохраняя жизнеспособность в течение 1-3 сут. Сперматозоид способен оплодотворить ооцит только после того, как проведет в женских половых путях несколько часов. Процесс направленного перемеще-

ния сперматозоидов по органам женского полового тракта длится около 10 ч. Как известно, в эякуляте содержится от десятков до сотен миллионов подвижных сперматозоидов с различной морфологией. Из огромного количества подвижных клеток только несколько сперматозоидов достигают ооцита (**рис. 1.19**).

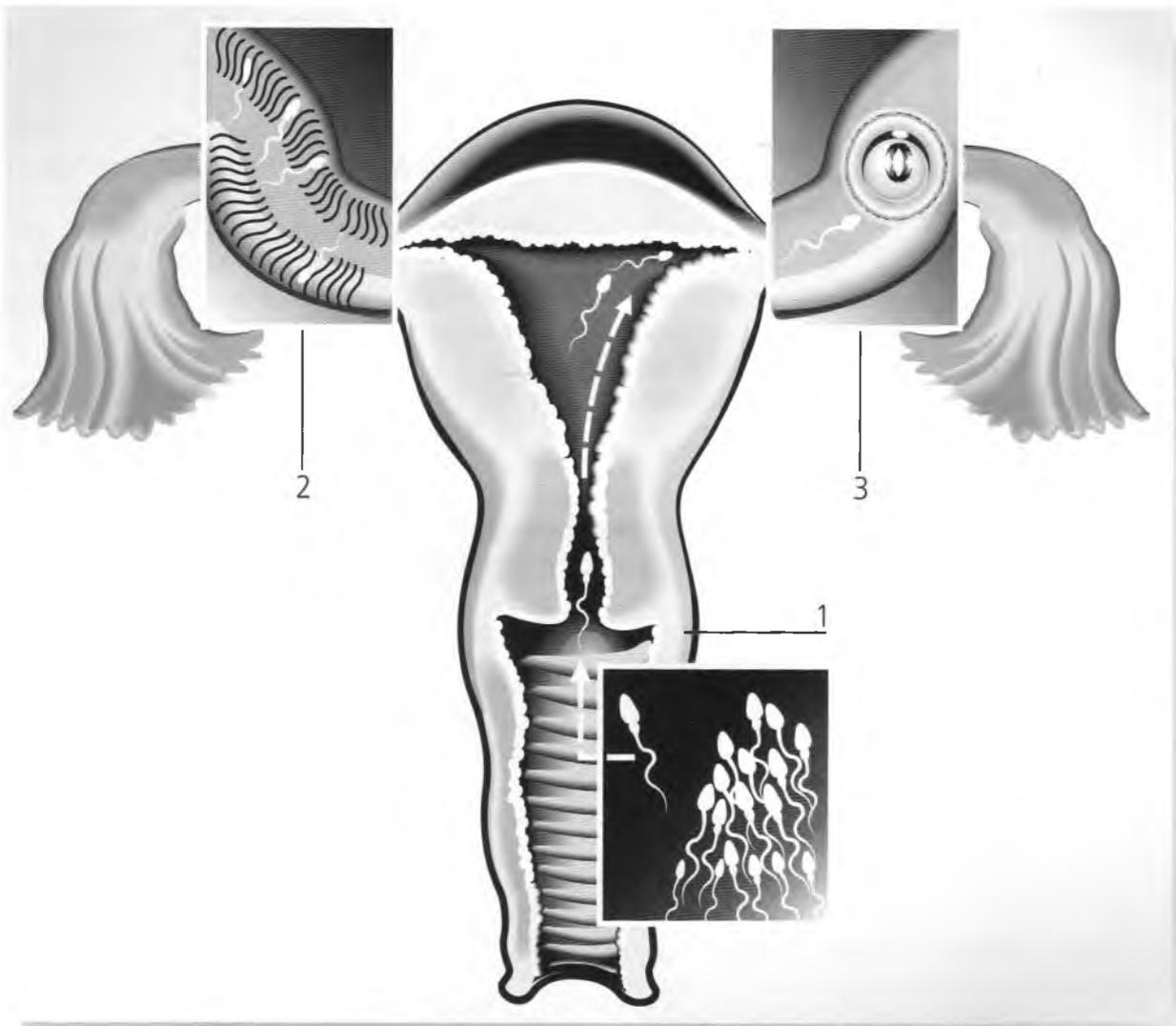


Рис. 1.19. Селекция сперматозоидов в различных участках женского репродуктивного тракта:

- 1 – селекция сперматозоидов на уровне цервикального канала;
- 2 – взаимодействие сперматозоидов с клетками эпителия фаллопиевых труб;
- 3 – верхнего участка фаллопиевой трубы достигают 10-20 сперматозоидов.

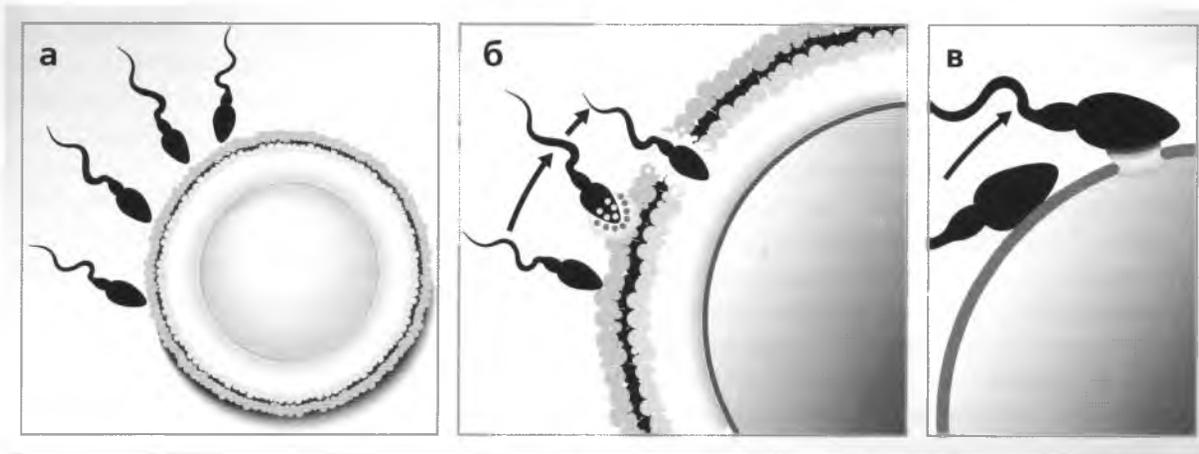


Рис. 1.20. Этапы оплодотворения:

проникновение сперматозоида в кумулюс (а);
 взаимодействие сперматозоида с зоной пеллюцида ооцита (б);
 соединение и слияние головки сперматозоида с плазматической мембраной ооцита (в).

Селекция большинства сперматозоидов происходит на уровне цервикального канала. Через цервикальную слизь в матку проникают около десятка тысяч сперматозоидов с активной поступательной подвижностью и нормальной морфологией. Непосредственно фаллопиевых труб достигают несколько сотен мужских половых клеток, что составляет около 1% от первоначального числа сперматозоидов, проникших в женский репродуктивный тракт. Ооцит-кумулюсный комплекс и зона пеллюцида зрелого ооцита выступают финальными "фильтрами" для сперматозоидов, в результате действия которых поверхности зоны пеллюцида достигают 10-20 сперматозоидов. Непосредственно оплодотворение происходит в верхних участках фаллопиевых труб. В этом процессе принимает участие один сперматозоид, оплодотворение же двумя (тремя) сперматозоидами приводит к образованию эмбриона с триплоидным или тетраплоидным набором хромосом.

Оплодотворение – сложный процесс, во время которого происходит слияние сперматозоида и ооцита, объединение их ядер, образование диплоидной зиготы, дающей начало новому организму. Генетическое значение оплодотворения состоит в объ-

единении гаплоидных наборов хромосом отцовских и материнских гамет, отличающихся высокой степенью генетического разнообразия, и в восстановлении диплоидности – зигота имеет диплоидный набор хромосом, что само по себе является толчком к последующим митотическим делениям.

Оплодотворение включает ряд последовательных этапов (**рис. 1.20**):

- первый этап – дистантное взаимодействие гамет – характеризуется сближением и дистантным взаимодействием сперматозоида и зрелого ооцита;
- второй этап – контактное взаимодействие гамет – непосредственное взаимодействие гамет, начинается с момента прикрепления сперматозоида к поверхности ооцита и осуществления контактных взаимодействий между ними;
- третий этап – синкарион – проникновение сперматозоида в зрелый ооцит, включающее собственно проникновение, кортикальную реакцию, набухание и сближение ядер, удвоение ДНК и центриолей, завершается объединением клеток, образованием зиготы и подготовкой зиготы к дроблению (начало первого деления).

Первая фаза оплодотворения (дистантное взаимодействие) включает пассивное движение ооцита и активно направ-

ленное движение сперматозоида. В конце этой фазы происходит встреча гамет с помощью процессов хемотаксиса и электротаксиса. Одновременно со сближением гамет осуществляется капацитация сперматозоидов – комплекс функциональных биохимических и биофизических преобразований поверхности головки и тела сперматозоида, в результате которых мужская половая клетка приобретает способность проникать в зрелый ооцит. Процесс капацитации продолжается около 5-7 ч, происходит в матке и фаллопиевых трубах и включает структурные и функциональные изменения сперматозоида: удаление с поверхности клетки факторов, блокирующих активность акросомы (факторы декапацитации); изменение структуры липидов и фосфолипидов клеточной оболочки сперматозоида; приобретение сперматозоидом способности к акросомной реакции, позволяющей осуществить слияние с ооцитом; оболочка головки и мембрана акросомы сперматозоида становятся лабильными, что в дальнейшем способствует разрыву акросомы и высвобождению ее содержимого; происходят изменения характера биения жгутика, в результате которых сперматозоид приобретает сверхактивную подвижность (гиперактивация сперматозоида). Механизм капацитации и биохимические преобразования в сперматозоиде во время этого процесса исследуются, известные к настоящему времени данные о капацитации получены в результате исследований *in vitro* (Primakoff and Myles, 2002). В семенной жидкости содержатся факторы, ингибирующие капацитацию: утероглобин, транскляминаза, холестерин. Наряду с этими факторами в семенной жидкости содержится белок, который стимулирует оплодотворение (*fertilization-promoting peptide*), способствуя капацитации и ингибируя спонтанную потерю акросомы. После капацитации сперматозоиды приобретают способность к акросомной реакции в ответ на физиологические стимулирующие факторы, к которым относятся белки зоны пеллюцида ооцита и прогестерон.

Вторая фаза оплодотворения подразумевает контактное взаимодействие гамет:

достигая зрелого ооцита, сперматозоиды связываются с фолликулярными клетками зернистой оболочки при помощи взаимодействия определенных рецепторов. В ходе связывания происходит разрушение межклеточных контактов фолликулярных клеток благодаря действию следующих факторов: белка мембраны сперматозоида PH20, который обладает гиалуронидазной активностью; секрета маточных труб; небольшого количества спонтанно выделившихся акросомных ферментов (пенетразы, гиалуронидазы). Помимо непосредственного действия на фолликулярные клетки, сперматозоиды своими гиперактивными движениями жгутиков обеспечивают освобождение ооцита от фолликулярных клеток. Этот процесс называется денудацией ооцита. У связавшегося с поверхностью ооцита сперматозоида начинается акросомная реакция, продолжительность которой составляет не более 20 сек. Последняя включает следующие процессы: разрыв плазмолеммы головки и акросомы; высвобождение ферментов акросомы, которые действуют непосредственно на прилегающий участок зоны пеллюцида ооцита, размягчая его; разъединение клеток зернистой оболочки гиалуронидазой; растворение зоны пеллюцида под воздействием акрозина и других ферментов. Акросомной реакции подвергаются лишь те сперматозоиды, которые прошли процесс капацитации. В стимуляции акросомной реакции важную роль играют молекулы кальция, ферменты фосфолипазы и ферменты акросомы, к которым относятся акрозин, эстеразы, неураминидаза, коллаген-подобная пептидаза, катепсин-подобная протеаза, серинпротеаза. Таким образом, во время акросомной реакции происходят последовательно два типа контактного взаимодействия сперматозоида с ооцитом: первоначально между наружной мембраной сперматозоида и зоной пеллюцида ооцита, а затем между акросомной мембраной и ооцитом. Сначала наблюдается связывание гамет, а затем при последующем взаимодействии – их слияние. В акросомной реакции принимают участие не только ферменты акросомы сперматозоида, но и белки зоны пеллюцида ооцита, к которым относятся

ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 (Lefievre et al., 2004). Зона пеллюцида играет решающую роль в прикреплении сперматозоида и, соответственно, в акросомной реакции, в предотвращении полиспермии, а также защищает эмбрион до его имплантации.

Один из сперматозоидов, первым преодолевший зону пеллюцида, прикрепляется к плазмолемме ооцита, после чего начинается третий, завершающий этап оплодотворения – синкарион, в ходе которого происходит собственно проникновение одного из связавшихся с оболочками ооцита сперматозоидов. После прикрепления сперматозоида, прошедшего акросомную реакцию, в ооцит проникают головка и средняя часть сперматозоида и, соответственно, его ядро и центриоли, в то время как плазматическая мембрана сперматозоида остается вне клетки. Следует указать, что в ооците центриоли отсутствуют. Проникновение сперматозоида в ооцит вызывает кортикальную реакцию, которая длится несколько секунд. В ходе кортикальной реакции происходят следующие процессы: изменение трансмембранного потенциала ооцита; появление перивителлинового пространства между плазмолеммой и зоной пеллюцида; потеря мембраной ооцита рецепторной активности; уплотнение зоны пеллюцида, которая утолщается и образует непроницаемую преграду поверх яйцеклетки – оболочку оплодотворения; выделение ооцитом гиногамонов I, вызывающих агглютинацию оставшихся сперматозоидов. Оболочка оплодотворения препятствует проникновению в ооцит других сперматозоидов. Одновременно с кортикальной реакцией в оплодотворенном ооците происходит завершение второго мейотического деления, которое было остановлено на стадии метафазы. В это же время в цитоплазме ооцита рассасывается хвост сперматозоида. Высококонденсированное ядро сперматозоида начинает набухать, увеличивается до размера ядра яйцеклетки, хромосомы деконденсируются, хроматин разрыхляется, и ядро превращается в структуру, называемую мужским пронуклеусом.

В процессе формирования пронуклеусов происходит синтез ДНК в мужском и

женском ядрах. В результате каждая хромосома удваивается и образуются две сестринские хроматиды. После завершения репликации ДНК пронуклеусы перемещаются к центру яйцеклетки, их мембраны разрушаются. В процессе сближения ядер происходит также удвоение центриолей, которые проникли в ооцит вместе с ядром сперматозоида. Этот процесс занимает около 24 ч. При соприкосновении пронуклеусов оболочки ядер разрушаются, начинается первое митотическое деление. Отцовские и материнские хромосомы, каждая из которых имеет по две хроматиды, прикрепляются к нитям сформировавшегося веретена деления и выстраиваются по экватору веретена. Наблюдается картина, характерная для метафазы митоза. Этот этап сопровождается медленным пассивным перемещением оплодотворенной яйцеклетки по трубам к матке.

Объединение отцовских и материнских хромосом в ходе митоза переводит оплодотворенную яйцеклетку в качественно новое состояние – зиготу. Зигота проходит стадии анафазы и телофазы, завершая первое митотическое деление. Образуются две дочерние диплоидные клетки – бластомеры. Генетический материал бластомеров представляет собой совокупность хромосом отца и матери: в каждой паре гомологичных хромосом одна хромосома отцовская, а другая – материнская.

Таким образом, процесс индивидуального развития начинается с момента оплодотворения и включает митотическое деление зиготы, этапы преимплантационного и пренатального развития. Пренатальный период сменяется перинатальным, который начинается с 28-й недели беременности, включает роды и заканчивается через семь дней после родов. Затем начинается постнатальный период, включающий жизнь человека до смерти.

В настоящее время процесс оплодотворения всесторонне исследуется в связи с развитием вспомогательных репродуктивных технологий, которые позволяют его осуществление вне организма – в условиях *in vitro*.

1.8. Мутации, типы мутаций

С того момента как Аристотель впервые описал плод, знания о биологии индивидуального развития и репродукции значительно расширились. Этому способствовали открытия в области микроскопических исследований (изучение клетки, описание сперматозоидов), исследования в органической химии (открытие гормона прогестерона в 1929 г.), а начиная с середины XX ст. – открытия в области молекулярной биологии и генетики. В 1978 г. была получена первая беременность в результате экстракорпорального оплодотворения. Конец XX–начало XXI ст. ознаменовались одним из последних достижений человечества: исследования в рамках проекта "Геном человека" позволили не только картировать геном человека, но и уточнить, а в некоторых аспектах даже изменить наше представление о структуре и функции наследственного аппарата. Упомянутые исследования позволили выявить гены, связанные с развитием моногенных заболеваний, получить данные о механизмах участия в формировании патологического фенотипа таких феноменов, как инактивация хромосомы X, парамутации, им-

принтинг, цитодукция, выделить новые формы патологии (прионные и митохондриальные болезни, болезни геномного импринтинга и экспансии тринуклеотидных повторов). Успехи в области молекулярной биологии и генетики способствовали внедрению молекулярных методов в практическую медицину с целью диагностики различных наследственных заболеваний. В настоящее время исследователи заняты изучением структуры продуктов экспрессии генов – РНК и белков, что составляет предмет исследования транскриптомики и протеомики, продолжается изучение регуляции процесса экспрессии (функциональная геномика). Среди картированных генов установлены гены, продукты которых участвуют в регуляции развития и функционирования гонад. Количество генов, действующих прямо или опосредованно на функционирование репродуктивной системы человека, колеблется от 3000 до 5000. Их можно подразделить на три группы: гены, которые экспрессируются только в половых клетках; гены, которые экспрессируются в гонадах; гены, которые активны в онтогенезе, т. е. на ранних ста-

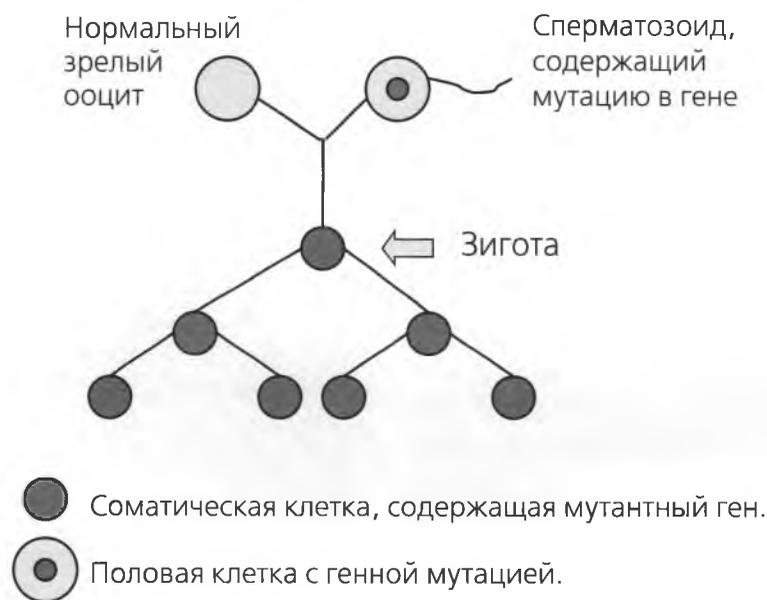


Рис. 1.21. Наследование генеративной мутации (в данном случае в сперматозоиде)

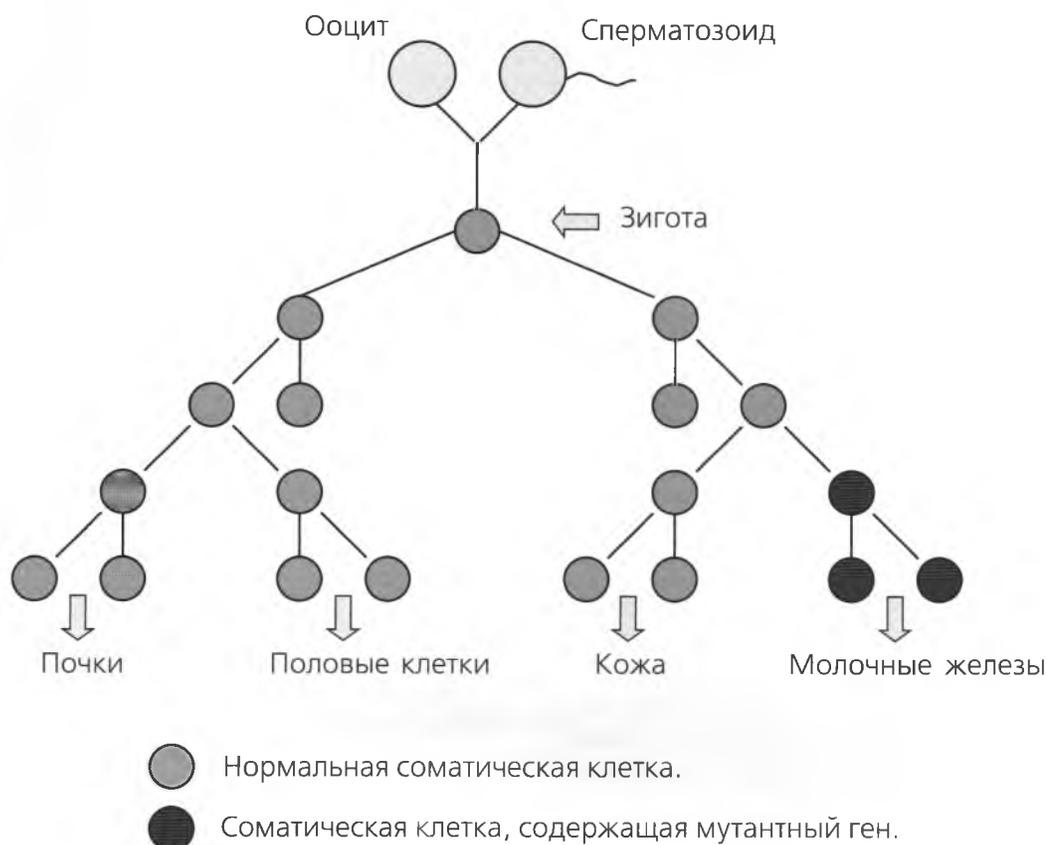


Рис. 1.22. Возникновение постзиготического мозаицизма, который приводит к соматическому мозаицизму

дях эмбриогенеза. Были выявлены и идентифицированы мутации, приводящие к нарушению процесса гаметогенеза. Среди генетических заболеваний, сопровождающихся бесплодием, первой была описана геномная мутация, а именно наличие дисомии хромосомы X у мужчины с синдромом Клайнфельтера. В последние годы молекулярные методы все шире применяются в репродуктивной медицине для диагностики генных и хромосомных мутаций, обуславливающих нарушения репродуктивной функции у человека.

В настоящее время проводится интенсивное исследование роли молекулярных механизмов в возникновении нарушений репродуктивной системы человека. Появляется все большее количество сообщений об участии генетического фактора в возникновении заболеваний, связанных с нарушением репродуктивной функции. Использование современных диагностических методов, в том числе и генетических, позволяет установить причину бесплодия в большинстве случаев.

Прежде чем рассматривать генетические аспекты нарушения репродуктивной функции у человека, необходимо дать основные представления о мутациях и их видах.

Мутация – это любое внезапно возникающее спонтанное или индуцированное изменение последовательности нуклеотидов ДНК. Мутации могут приводить к тем или иным изменениям морфологических, физиологических или биохимических признаков особи (в совокупности называемых фенотипом организма) (С.М. Гершензон, 1991). Мутации в половых клетках, или генеративные мутации, возникают во время гаметогенеза, передаются по наследству и лежат в основе наследственных заболеваний (рис. 1.21). Мутации, происходящие в соматических клетках (соматические), приводят к присутствию в организме патологических клеточных клонов (возникает клеточный мозаицизм) и наблюдаются при онкологических заболеваниях (рис. 1.22). При клонировании соматические мутации переводятся в "герминативные".

В зависимости от размера участка генома, подвергающегося мутации, различают геномные, хромосомные и генные мутации. В настоящее время наследственные болезни подразделяют на хромосомные, моногенные, мультифакториальные, митохондриальные, болезни импринтинга. Хромосомные заболевания возникают в результате численных или структурных аномалий хромосом (геномные и хромосомные мутации) и встречаются в 5-6 случаях на 1000 новорожденных. Основную группу наследственных болезней составляют моногенные заболевания, обусловленные нарушением функции единичного гена. Мутации в гене приводят к изменению его структуры и, соответственно, к отсутствию продукта или продуцированию аномального. В зависимости от расположения поврежденного гена на хромосоме моногенные заболевания могут быть аутосомными, X-сцепленными, Y-сцепленными. Суммарная частота моногенных болезней составляет примерно 1 случай на 300 новорожденных. Известно около 6000 моногенных болезней. Наиболее многочисленную группу наследственных заболеваний составляют мультифакториальные генетические болезни, к которым и относятся многие нарушения репродуктивной функции. Митохондриальные болезни обусловлены генетическими и структурно-биохимическими дефектами митохондрий и сопровождаются нарушением тканевого дыхания. Митохондриальные болезни наследуются в зависимости от локализации генетического дефекта, а именно в митохондриях или ядре. Нарушение в гене митохондрий наследуется только по материнской линии. Мутация в ядерном гене, кодирующем синтез митохондриального белка, обуславливает менделевский тип наследования заболевания; наиболее распространены аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный типы наследования.

Следует также указать недавно выделенные в отдельную группу наследственных заболеваний болезни импринтинга, в основе которых лежит явление генетического импринтинга. Последний представляет собой эпигенетический процесс, в ходе которого определенные локусы хромосом одного из родителей дифференциально "маркируются", что приводит к выключе-

нию экспрессии генов, расположенных в этих локусах. В результате импринтинга в определенных участках генома происходит не биаллельная (в норме) экспрессия генов, а моноаллельная: импринтирован отцовский ген, экспрессируется материнский и наоборот. В настоящее время известно более 30 генов, подверженных импринтингу и имеющих моноаллельную экспрессию. Кластеры генов, подверженных импринтингу, выявлены также на хромосомах 7 (7q32), 11 (11p15) и 15 (15q11.2-13). Одним из примеров болезней импринтинга является синдром Прадера-Вилли, для которого характерны умственная отсталость, ожирение, бесплодие.

Генетические заболевания, связанные с нарушением репродуктивной функции, могут встречаться как у мужчин, так и у женщин, среди них наиболее распространены и изучены геномные и хромосомные мутации.

1.8.1. Геномные и хромосомные мутации

Выявление и идентификация хромосомных аномалий основываются на проведении цитогенетического анализа, который позволяет изучить кариотип обследуемого. Различают нормальный (46,XX или 46,XY) и патологический кариотипы, последний обусловлен численными или структурными изменениями хромосом – геномными или хромосомными мутациями, соответственно. В основе геномных и хромосомных мутаций лежит изменение ploидности и количества или структуры хромосомы.

Хромосомные аномалии могут возникать во время гаметогенеза, что приводит к образованию гамет с аномальным набором хромосом, а также в процессе образования зиготы или на ранних стадиях дробления эмбриона. В последнем случае наблюдают мозаичный вариант хромосомной аномалии, при котором в организме присутствуют линии клеток с нормальным и аномальным кариотипом. Повышенный уровень мозаичных вариантов анеуплоидии выявляют у спонтанных абортусов (Zlotogora, 1998; Youssoufian and Pyeritz, 2002). Один из типов мозаицизма представляет ограниченный пла-

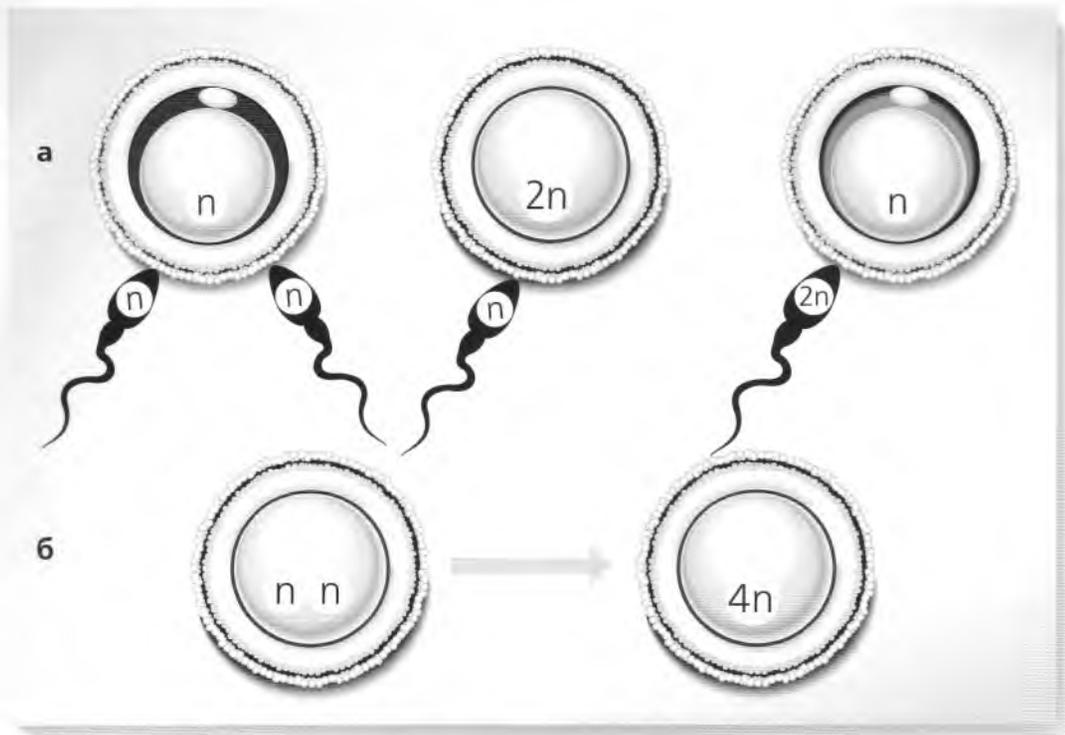


Рис. 1.23. Механизмы возникновения триплоидии (а) и тетраплоидии (б)

центарный мозаицизм, характеризующийся наличием хромосомной аномалии в провизорных тканях зародыша – хорионе или плаценте, тогда как кариотип самого плода нормальный (И.Н. Лебедев и С.А. Назаренко, 2001).

Хромосомная патология является одной из причин прерывания беременности на ранних сроках, мертворождения или рождения ребенка с множественными врожденными пороками развития, а также бесплодия, как у женщин, так и у мужчин. Суммарный вклад хромосомных аномалий во внутриутробную гибель плода составляет 45%, при этом частота выявления хромосомных аномалий у спонтанных абортусов на разных этапах беременности варьирует и составляет 60-70% случаев в сроке 2-4-х недель, 60% случаев в I триместре, 25-30% случаев во II триместре и 7% случаев после 20-й недели беременности (Sierra and Stephenson, 2006). Отмечено следующее распределение хромосомных мутаций у плодов, замерших в первом триместре беременности: трисомия аутосом – около 50%, моносомия аутосом – 20%, триплоидия – 15%, остальные случаи – структурные аномалии и тетраплоидия

(С.Г. Ворсанова и Ю.Б. Юров, 1999; И.Н. Лебедев и С.А. Назаренко, 2001; Vorsanova et al., 2003, 2005).

По данным неизбирательных популяционных исследований живорожденных детей частота встречаемости болезней, которые сопровождаются пороками развития, составляет 2,4/1000 новорожденных, среди мертворожденных или умерших до года – 22 случая на 1000. Частота встречаемости хромосомных аномалий среди новорожденных составляет 5-7/1000, при этом около 25% приходится на трисомии аутосом, около 35% – на аномалии, связанные с половыми хромосомами (гоносомами), и приблизительно 40% – на сбалансированные и несбалансированные структурные аномалии хромосом (С.Г. Ворсанова и др., 1999б, 2006; Ю.Б. Юров и С.Г. Ворсанова, 2001; Hassold and Hunt, 2001). Аномалии в системе аутосом, в основном трисомии аутосом, составляют около 90% всех хромосомных болезней.

В сперматозоидах хромосомные аномалии выявляют приблизительно в 10% случаев, из них анеуплоидию – в 3-4%, структурные перестройки – в 6-7% (Pieters et al., 1990; Pellestor, 1991; Pellestor et al., 2002). Среди

Таблица 1.4. Частота анеуплоидии на разных стадиях развития (цит. по Hassold and Hunt, 2001)

Показатель	Сперматозоиды	Ооциты	Недели гестации			
			0	6–8	20	40
			Эмбрионы до имплантации	Самопроизвольные аборты	Мертворожденные	Новорожденные
Частота анеуплоидии, %	1–2	20	20	35	4	0,3
Наиболее распространенные варианты анеуплоидии	Различные	Различные	Различные	45,X; трисомия хромосом 16, 21, 22	Трисомия хромосом 13, 18, 21	Трисомия хромосом 13, 18, 21, 47,XXX; 47,XXY; 47,XXY

ооцитов 20-25% имеют анеуплоидию, 1% ооцитов содержит структурную перестройку (Martin et al., 1991). Примерно 10-15% презембрионов содержат хромосомную аномалию, из них 95% элиминируются.

Благодаря интенсивному изучению хромосом человека в норме и при патологических состояниях сложилось учение о хромосомной патологии (геномные и хромосомные мутации). На сегодня число описанных хромосомных перестроек приближается к 1000, однако не более 100 из них имеют четкую клиническую картину и называются хромосомными синдромами.

Выделяют два типа геномных мутаций, или численных изменений хромосомного набора:

- полиплоидию – умножение полного хромосомного набора, кратное гаплоидному числу хромосом ($n = 23$);
- анеуплоидию – увеличение или уменьшение числа хромосом в кариотипе, не кратное гаплоидному.

Среди полиплоидий выявляют триплоидию ($3n$) и тетраплоидию ($4n$) (рис. 1.23). В большинстве случаев триплоидию и тетраплоидию наблюдают в тканях спонтанных абортусов. Результаты молекулярных исследований показали, что в большинстве случаев триплоидия имеет отцовское происхождение: в 66% случаев триплоидия возникает в результате оплодотворения двумя сперматозоидами, в 10 и 24% случаев – вследствие наличия диплоидного набора хромосом в ооците или сперматозоиде, соответ-

ственно (Zaragoza et al., 2000; Egozcue et al., 2002; Golubovsky, 2003) (рис. 1.23а). Тетраплоидия возникает в результате эндомитоза: количество ДНК удвоено, однако первое митотическое деление отсутствует (рис. 1.23б).

Известны три варианта триплоидии: 69,XXX, 69,XXY, 69,XXY. Триплоидию выявляют приблизительно в 1% всех зачатий и более чем в 10% случаев всех самопроизвольных абортов (Golubovsky, 2003). Описаны отдельные случаи наличия немозаичного варианта полиплоидии у новорожденных (И.В. Соловьев и др., 1995; С.Г. Ворсанова и др., 2006; Iourov et al., 2006).

Анеуплоидия включает трисомию аутосом, полисомию половых хромосом, а также моносомию. Анеуплоидия – наиболее распространенная хромосомная патология у человека (табл. 1.4). Среди новорожденных анеуплоидию выявляют у 1 из 300, большинство из них имеют анеуплоидию гоносом или трисомию хромосомы 21 (синдром Дауна) (И.В. Соловьев и др., 1995; С.Г. Ворсанова и Ю.Б. Юров, 1999; Soloviev et al., 1995а,б; Vorsanova et al., 2003б). Среди спонтанных абортусов у одного из трех выявляют анеуплоидию, в большинстве случаев обусловленную моносомией хромосомы X (кариотип 45,X) или трисомией хромосомы 16 (С.Г. Ворсанова и Ю.Б. Юров, 1999; Vorsanova et al., 2003а).

Среди моносомий у новорожденных выяв-

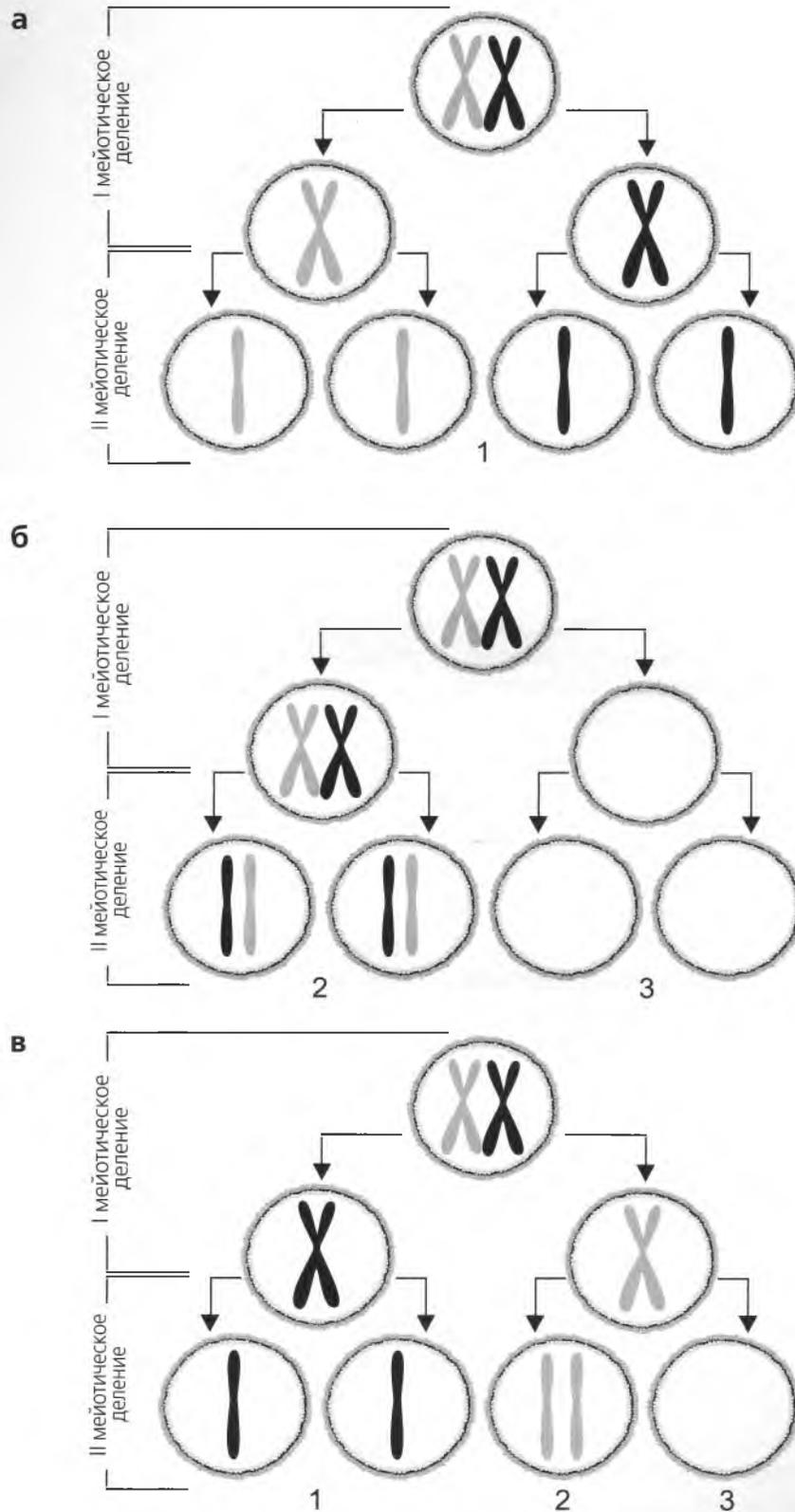


Рис. 1.24. Различные варианты нерасхождения хромосом: расхождение хромосом в норме (а); нерасхождение хромосом в I мейотическом делении (б); нерасхождение хромосом во II мейотическом делении (в). Схема: 1 – гаметы с нормальным набором хромосом; 2 – дисомия; 3 – нуллисомия.

Таблица 1.5. Типы структурных хромосомных аномалий у человека

Показатель	Типы хромосомных перестроек	
	Задействована одна хромосома	Задействованы две хромосомы
Один разрыв	Терминальная делеция	—
Два разрыва	Интерстициальная делеция	Реципрокная транслокация
	Инверсия	Робертсоновская транслокация
	Кольцевая хромосома	Дупликация или делеция в результате неравной рекомбинации
	Дупликация или делеция вследствие неравных обменов между сестринскими хроматидами	
Три разрыва	Различные типы перестроек, в том числе инверсии с делецией, внутривхромосомная инсерция	Межхромосомная инсерция (прямая или инвертированная)

ляют только моносомию хромосомы X (синдром Шерешевского–Тернера). Наиболее распространенными вариантами трисомии аутосом являются трисомия хромосомы 13 (синдром Патау), трисомия хромосомы 18 (синдром Эдвардса), трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна) (фото 1.8, 1.9). У спонтанных абортусов, помимо перечисленных трисомий, также выявляют трисомию хромосом 8, 9, 16 и 22. Трисомия хромосомы 16 – наиболее распространенная хромосомная анеуплоидия у эмбрионов и абортусов, спонтанно элиминированных в первом триместре беременности (фото 1.10).

Анеуплоидия половых хромосом известна в виде моносомии хромосомы X (45,X) при синдроме Шерешевского–Тернера, полисомии хромосомы X у женщин (трисомия, тетрасомия и пентасомия хромосомы X), дисомии хромосомы X при синдроме Клайнфельтера (47,XXY), дисомии хромосомы Y (47,XYY). Во всех перечисленных случаях у их носителей наблюдают нарушение репродуктивной функции (С.Г. Ворсанова и др., 1998, 1999а,б, 2006; Л.Ф. Курило и др., 1998). Механизм возникновения анеуплоидии интенсивно исследуется как на модельных системах, так и у человека (О.А. Подугольникова, 1988; Т.И. Бужиевская и Т.В. Выговская, 1990; Б.Ф. Чадов, 1991; С.Г. Ворсанова и др., 2006; Savage et al., 1998; Zwick et al., 1999; Hassold et al., 2000, 2004; Mahmood et al., 2000; Zaragoza et al., 2000; Hassold and Hunt, 2001; Thomas et al., 2001; Hunt and Hassold, 2002; Vorsanova et al., 2003, 2005; Iourov et al., 2006). В основе возникновения численных

аномалий хромосом лежит нарушение сегрегации хромосом или сестринских хроматид во время мейоза, что приводит к нерасхождению хромосом в первом или втором мейотических делениях и возникновению гамет с дисомией и нуллисомией той или иной хромосомы (рис. 1.24).

Согласно результатам молекулярных исследований нерасхождение хромосом чаще происходит в материнских клетках, при этом преобладает нерасхождение во время первого мейотического деления (табл. 1.4). Трисомия хромосомы 18 возникает в результате ошибок во время второго мейотического деления, тогда как трисомия хромосом 7 и 8 наиболее часто является результатом митотического нерасхождения. В равной степени участие материнской и отцовской дополнительной хромосомы X отмечено при синдроме Клайнфельтера (Iitsuka et al., 2001).

Хромосомные мутации, или структурные аномалии хромосом, могут затрагивать как целую хромосому, так и ее часть, при этом происходит изменение количества генетического материала или его перемещение. Структурные перестройки хромосом составляют наиболее разнообразную группу среди всех хромосомных аномалий (табл. 1.5 и рис. 1.25).

Различают сбалансированные и несбалансированные хромосомные мутации. При сбалансированном кариотипе у человека присутствует весь набор генов, однако расположение их в пределах хромосомы или между хромосомами отличается от нормального. Несбалансированный карио-

Таблица 1.5. Типы структурных хромосомных аномалий у человека

Показатель	Типы хромосомных перестроек	
	Задействована одна хромосома	Задействованы две хромосомы
Один разрыв	Терминальная делеция	—
Два разрыва	Интерстициальная делеция	Реципрокная транслокация
	Инверсия	Робертсоновская транслокация
	Кольцевая хромосома	Дупликация или делеция в результате неравной рекомбинации
	Дупликация или делеция вследствие неравных обменов между сестринскими хроматидами	
Три разрыва	Различные типы перестроек, в том числе инверсии с делецией, внутривхромосомная инсерция	Межхромосомная инсерция (прямая или инвертированная)

ляют только моносомию хромосомы X (синдром Шерешевского–Тернера). Наиболее распространенными вариантами трисомии аутосом являются трисомия хромосомы 13 (синдром Патау), трисомия хромосомы 18 (синдром Эдвардса), трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна) (фото 1.8, 1.9). У спонтанных абортусов, помимо перечисленных трисомий, также выявляют трисомию хромосом 8, 9, 16 и 22. Трисомия хромосомы 16 – наиболее распространенная хромосомная анеуплоидия у эмбрионов и абортусов, спонтанно элиминированных в первом триместре беременности (фото 1.10).

Анеуплоидия половых хромосом известна в виде моносомии хромосомы X (45,X) при синдроме Шерешевского–Тернера, полисомии хромосомы X у женщин (трисомия, тетрасомия и пентасомия хромосомы X), дисомии хромосомы X при синдроме Клайнфельтера (47,XXY), дисомии хромосомы Y (47,XY). Во всех перечисленных случаях у их носителей наблюдают нарушение репродуктивной функции (С.Г. Ворсанова и др., 1998, 1999а,б, 2006; Л.Ф. Курило и др., 1998). Механизм возникновения анеуплоидии интенсивно исследуется как на модельных системах, так и у человека (О.А. Подугольникова, 1988; Т.И. Бужиевская и Т.В. Выговская, 1990; Б.Ф. Чадов, 1991; С.Г. Ворсанова и др., 2006; Savage et al., 1998; Zwick et al., 1999; Hassold et al., 2000, 2004; Mahmood et al., 2000; Zaragoza et al., 2000; Hassold and Hunt, 2001; Thomas et al., 2001; Hunt and Hassold, 2002; Vorsanova et al., 2003, 2005; Iourov et al., 2006). В основе возникновения численных

аномалий хромосом лежит нарушение сегрегации хромосом или сестринских хроматид во время мейоза, что приводит к нерасхождению хромосом в первом или втором мейотических делениях и возникновению гамет с дисомией и нуллисомией той или иной хромосомы (рис. 1.24).

Согласно результатам молекулярных исследований нерасхождение хромосом чаще происходит в материнских клетках, при этом преобладает нерасхождение во время первого мейотического деления (табл. 1.4). Трисомия хромосомы 18 возникает в результате ошибок во время второго мейотического деления, тогда как трисомия хромосом 7 и 8 наиболее часто является результатом митотического нерасхождения. В равной степени участие материнской и отцовской дополнительной хромосомы X отмечено при синдроме Клайнфельтера (Iitsuka et al., 2001).

Хромосомные мутации, или структурные аномалии хромосом, могут затрагивать как целую хромосому, так и ее часть, при этом происходит изменение количества генетического материала или его перемещение. Структурные перестройки хромосом составляют наиболее разнообразную группу среди всех хромосомных аномалий (табл. 1.5 и рис. 1.25).

Различают сбалансированные и несбалансированные хромосомные мутации. При сбалансированном кариотипе у человека присутствует весь набор генов, однако расположение их в пределах хромосомы или между хромосомами отличается от нормального. Несбалансированный карио-

тип подразумевает наличие дополнительного хромосомного материала или отсутствие части хромосомного материала.

Носители сбалансированного кариотипа фенотипически нормальны, однако у них может наблюдаться бесплодие, невынашивание беременности, рождение ребенка с врожденными пороками развития, что обусловлено несбалансированным кариотипом гамет.

При несбалансированном кариотипе наблюдают нехарактерный для человека набор хромосомного материала – частичную (неполную) трисомию или частичную (неполную) моносомию определенного участка хромосомы. Для носителей несбалансированного кариотипа характерны тяжелые врожденные пороки развития.

Согласно линейной последовательности расположения генов выделяют следующие структурные перестройки: делеции (недостаток), дупликации (удвоение), инверсии (переворот на 180°), инсерции (вставка), транслокации (перемещение участка(-ов) хромосом), кольцевые хромосомы, изохромосомы.

Делеции представляют собой отсутствие хромосомного материала, что обуславливает частичную (неполную) моносомию. Различают делеции всего плеча хромосомы, участка хромосомы (интерстициальные делеции), конца одного плеча хромосомы (терминальные делеции), терминальных участков р- и q-плеч одной хромосомы, последние приводят к образованию кольцевой хромосомы (**рис. 1.25а-г**). Первыми были идентифицированы случаи отсутствия всего плеча хромосомы или его терминальной части (60-е гг. XX ст.). Спустя 20 лет ученые описали интерстициальные делеции, выявленные при анализе прометафазных хромосом. В настоящее время выделена группа синдромов, именуемых "синдромы частичных (неполных) анеуплоидий", в основе которых лежат делеции или дупликации участков хромосом, приводящие к частичной моносомии или частичной трисомии (**фото 1.11**).

Дупликации (или частичные трисомии) определяются как удвоение генетического

материала. Такие дупликации называют тандемными (**рис. 1.25д**). Различают прямые и инвертированные дупликации. Кольцевые хромосомы формируются в результате одновременной делеции терминальных участков короткого и длинного плеч определенной хромосомы. Хромосомный материал после делеции объединяется в кольцо, а терминальные участки теряются (**рис. 1.25г**). Клинические проявления, наблюдаемые у носителей кольцевых хромосом, обусловлены нехваткой (делецией) терминальных участков. В литературе описаны случаи кольцевых хромосом, происходящих от всех 23 пар (Schinzel, 2001). Большинство кольцевых хромосом нестабильны во время митотического деления, поэтому в основном их выявляют только в определенном проценте клеток, при этом другие клетки могут быть моносомными по кольцевой хромосоме.

Инверсии определяются как переворот хромосомного материала на 180° (**рис. 1.25е, ж**). Различают перичентрические и парацентрические инверсии. Перичентрические инверсии возникают в результате двухточечного разрыва и воссоединения хромосомного материала по обе стороны от центромеры с переворотом на 180° и изменением центромерного индекса. Общепопуляционная частота указанного типа структурных хромосомных перестроек составляет 1-2%. Наиболее распространенные варианты перичентрических инверсий включают $inv(1)(p13q21)$, $inv(2)(p11.2q13)$, $inv(3)(p11.2q12)$, $inv(9)(p12q13)$, $inv(10)(p11.2q21.2)$, $inv(16)(p11.2q12.1)$, $inv(Y)(p11.2q21.2)$. Отдельные из них представлены на **фото 1.12**.

Парацентрические инверсии являются результатом разрыва и воссоединения хромосомного материала в одном из плеч хромосомы по одну сторону от центромеры с поворотом на 180° (**рис. 1.25ж**). Инверсии сегментов внутри одного плеча хромосомы встречаются как у здоровых индивидов, так и среди пациентов с врожденными пороками. Популяционная частота указанной структурной перестройки составляет 0,09-0,49/1000 (Fryns and Van den Berghe, 1980; Pettenati et al., 1995). В большинстве случаев

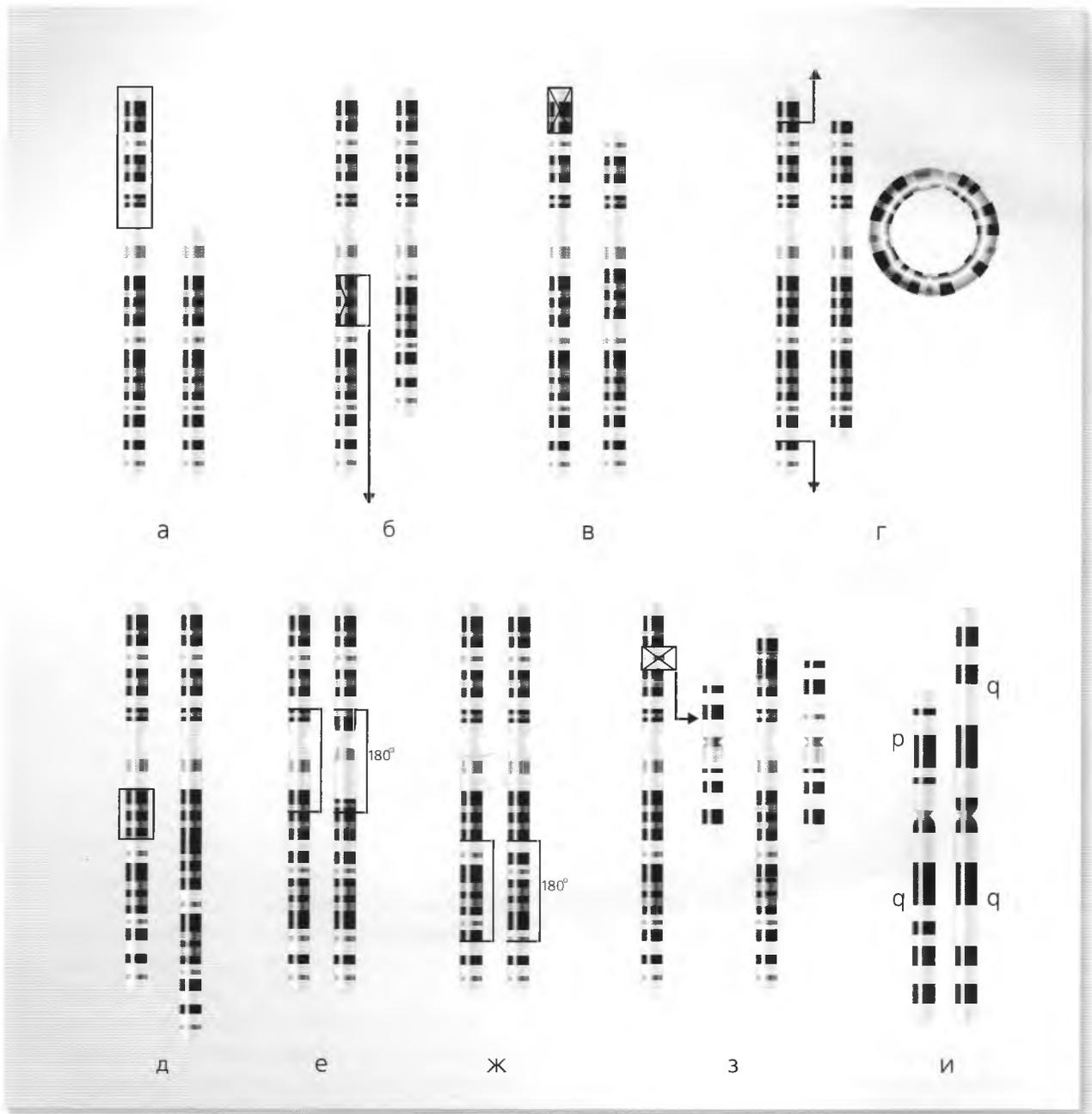


Рис. 1.25. Варианты хромосомных мутаций:

делеция всего плеча (а); интерстициальная делеция (б); терминальная делеция (в); образование кольцевой хромосомы (г); дупликация (д); инверсия перичентрическая (е); инверсия парацентрическая (ж); инсерция (з); образование изохромосомы (и).

(66%) парацентрические инверсии унаследованы. Наиболее часто в парацентрические инверсии вовлечены хромосомы 1, 3, 5, 6, 7, 11, 14, реже – хромосомы 4, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и Y (Pettenati et al., 1995). Отсутствуют сообщения о парацентрических инверсиях в р-плече хромосом 18 и Y и q-плече хромосом 19 и 20. Следует сказать, что парацентрические инверсии выявить значительно труд-

нее, чем перичентрические.

Инсерции определяются как встраивание хромосомного материала одной хромосомы в другую, при этом происходит разрыв в хромосомном материале по трем точкам (**рис. 1.25з**). Кариотип при указанном типе структурной перестройки остается сбалансированным. Инсерции бывают прямыми и инвертированными

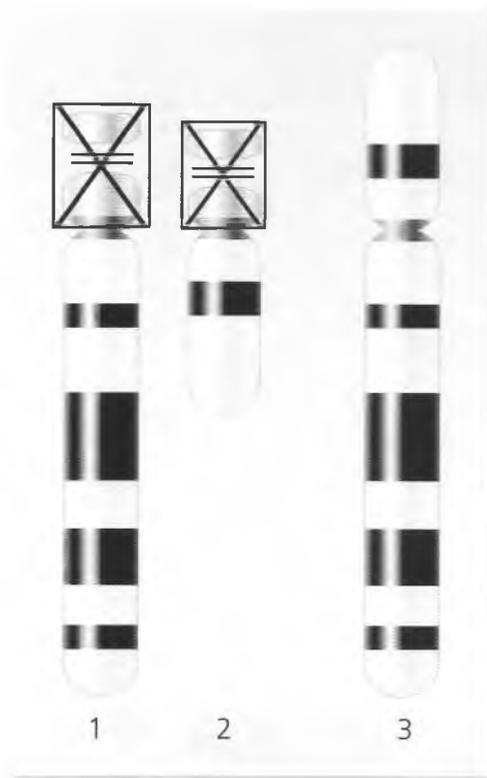


Рис. 1.26. Механизм образования робертсоновской транслокации – центрическое слияние. Схема:

1 – хромосома 13;

2 – хромосома 22;

3 – дериват хромосом 13 и 22 (der(13;22)(q10;q10)).

(сегмент, который встраивается в другую хромосому, перевернут на 180°). Частота встречаемости инсерций составляет 1/5000 индивидов (Madan and Menko, 1992). Аномальное расположение сегментов в хромосомах у носителей инсерции может привести к рождению детей как с нормальным, так и со сбалансированным и несбалансированным (в результате дупликации или делеции инвертированного сегмента) кариотипом. Риск рождения ребенка с несбалансированным кариотипом достаточно высок – до 50%, в связи с чем рекомендована пренатальная диагностика плода.

Изохромосомы определяются как хромосомы, у которых оба плеча идентичны в результате потери материала целого плеча и дупликации материала другого плеча хромосомы (рис. 1.25и). Другими словами, в кариотипе можно наблюдать два идентичных коротких (p) плеча или два идентичных длинных (q) плеча определенной хромосомы. Кариотип носителя изохромосомы со-

держит 46 хромосом, однако присутствует частичная моносомия и частичная трисомия целого плеча (фото 1.13).

Дополнительные изохромосомы с одной или двумя центромерами описаны для следующих плеч хромосом: 8p, 9p, 12p, 18p и 18q и Xq. Также известны спорадические и семейные случаи изохромосом коротких плеч акроцентрических хромосом, в которых содержится только гетерохроматиновый материал. Случаи дополнительных изодицентрических хромосом, которые содержат эухроматин от длинных плеч акроцентрических хромосом, описаны для хромосом 14(q11 и q12), 15(q12-13), 21(q11), 22(q11).

Робертсоновские транслокации (центрические слияния) являются наиболее распространенным типом хромосомных перестроек у человека и представляют собой объединение двух акроцентрических хромосом. При центрическом слиянии происходит потеря коротких плеч

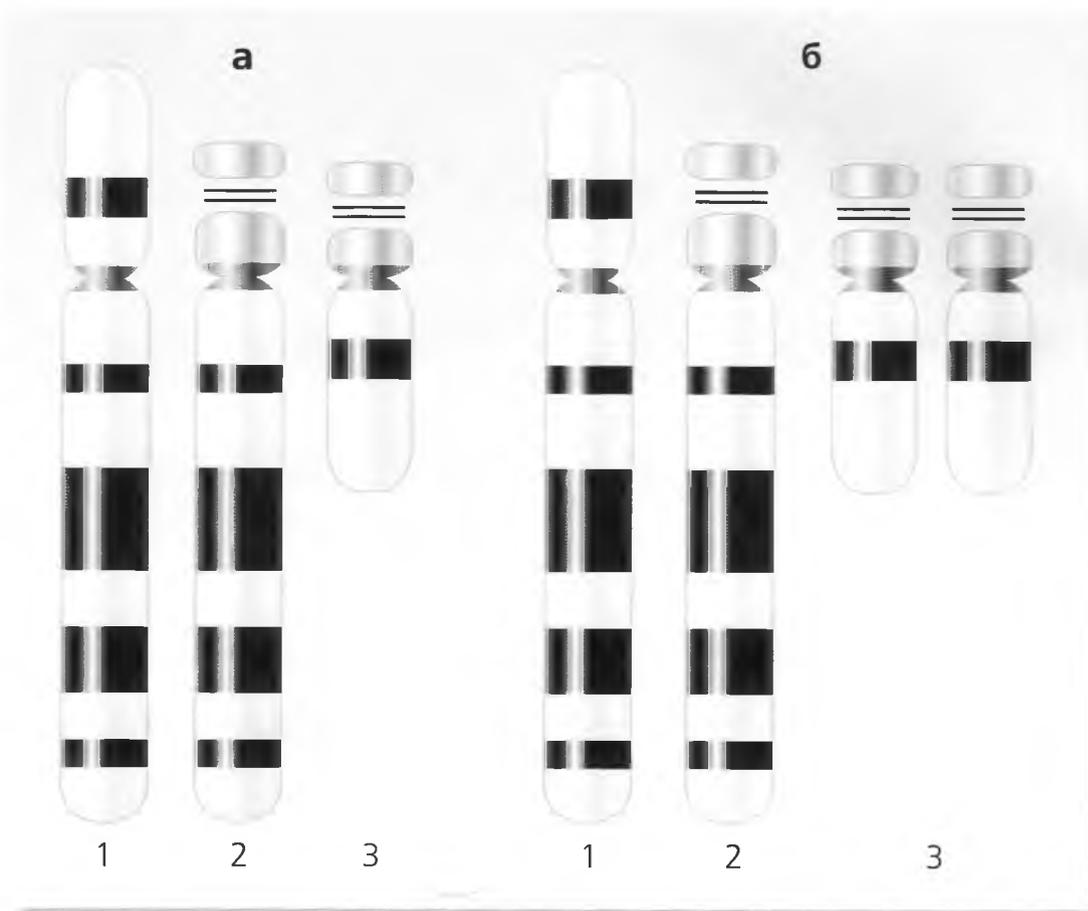


Рис. 1.27. Сбалансированная (а) и несбалансированная (б) робертсоновские транслокации. Идиограмма:
 1 – дериват хромосом 13 и 22 ($der(13;22)(q10;q10)$);
 2 – хромосома 13; 3 – хромосома 22.

двух акроцентрических хромосом, точки разрыва находятся в районе центромеры или по центромере обеих акроцентрических хромосом, в большинстве случаев одна из центромер отсутствует (**рис. 1.26**).

В то же время описаны случаи сохранения обеих центромер (образуется дицентрическая хромосома).

В робертсоновских транслокациях принимают участие все пять пар акроцентрических хромосом (**фото 1.14**). В большинстве случаев в робертсоновских транслокациях принимают участие две негомологичные хромосомы, и образованная дериватная хромосома может быть моноцентрической или дицентрической. Число хромосом в кариотипе при сбалансированной робертсоновской транслокации составляет 45, однако количество генетического материала не меняется, а потеря коротких плеч не влечет

клинических последствий. Общепопуляционная частота встречаемости робертсоновских транслокаций составляет 0,1%, у пациентов с нарушением репродуктивной функции – 1%; среди спонтанных абортусов – 5% (Gravholt et al., 1992; Munne et al., 2000). Наиболее часто робертсоновские транслокации происходят между хромосомами 13 и 14; 14 и 21 ($t(13;14)(q10;q10)$ и $t(14;21)(q10;q10)$) с частотой 73 и 8%, соответственно, от всех носителей робертсоновских транслокаций (И.Ю. Юров и др., 2004; Munne et al., 2000).

При робертсоновской транслокации во время первого мейотического деления хромосомы конъюгируют, образуя комплекс из трех хромосом. В результате альтернативного расхождения образуются гаметы с нормальным и сбалансированным набором хромосом, тогда как в результате совместного расхождения – два типа дисомных и

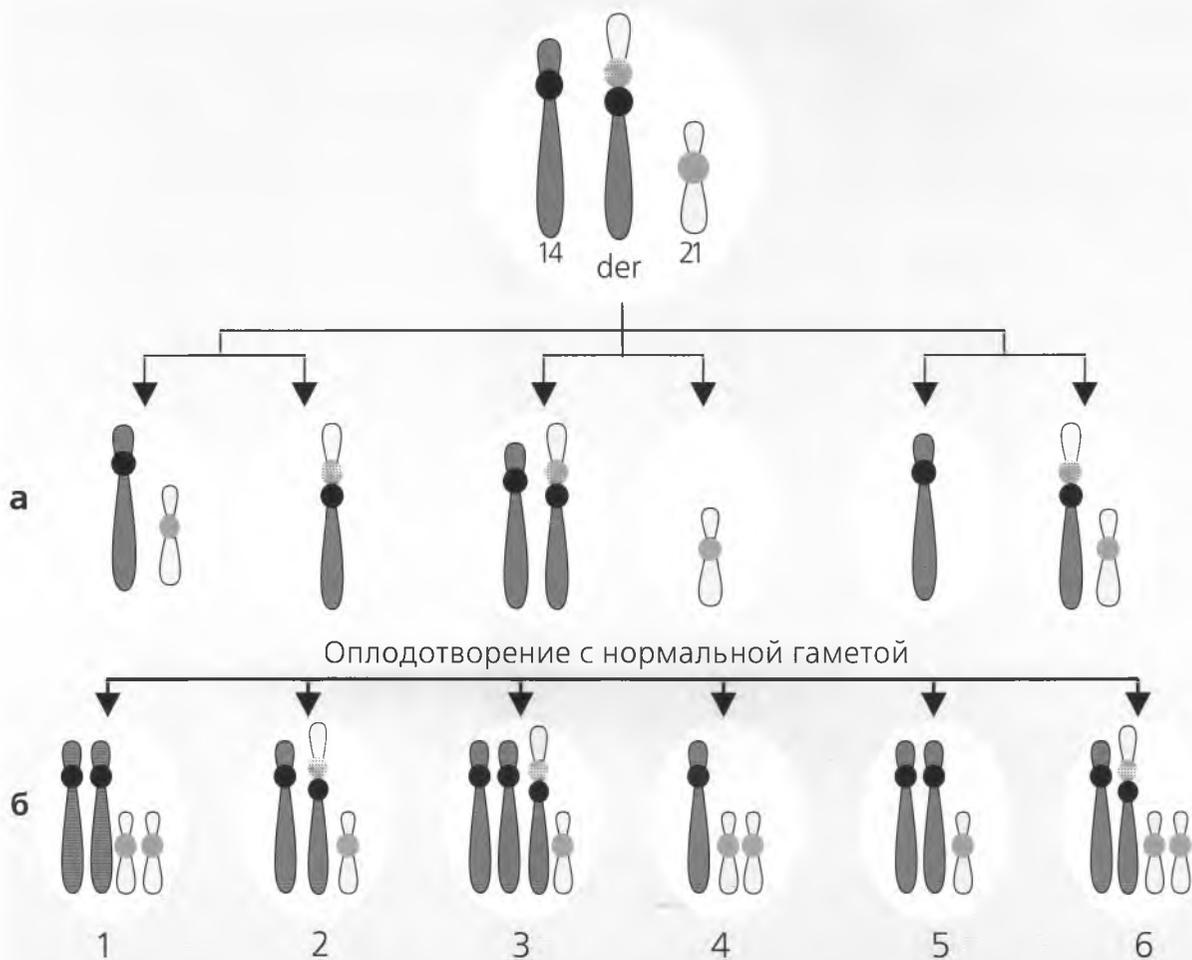


Рис. 1.28. Варианты хромосомного набора у детей, один из родителей которых является носителем робертсоновской транслокации: варианты гамет (а), варианты зигот после оплодотворения с нормальной гаметой (б). Схема:

- 1 – нормальный кариотип; 2 – сбалансированный кариотип;
- 3 – несбалансированный кариотип: наличие двух хромосом 14, одной хромосомы 21 и деривата хромосом 14 и 21;
- 4 – несбалансированный кариотип: наличие одной хромосомы 14 и двух хромосом 21;
- 5 – несбалансированный кариотип: наличие двух хромосом 14 и одной хромосомы 21;
- 6 – несбалансированный кариотип: наличие одной хромосомы 14, двух хромосом 21 и деривата хромосом 14 и 21.

два типа нуллисомных гамет (Zaragoza et al., 1994). Таким образом, гаметы носителей робертсоновской транслокации содержат сбалансированный или несбалансированный кариотип (рис. 1.27).

При слиянии гамет, одна из которых имеет несбалансированный кариотип, эмбрион будет иметь несбалансированный кариотип, что приводит к остановке его развития на самых ранних этапах эмбриогенеза, к спонтанному выкидышу в первом

триместре беременности или рождению ребенка с несбалансированным кариотипом (рис. 1.28). Так, до 4% детей с синдромом Дауна являются носителями несбалансированной транслокации с вовлечением хромосомы 21.

В большинстве случаев у носителей сбалансированных робертсоновских транслокаций фенотипические отклонения отсутствуют, и такая транслокация может сегрегировать в нескольких поколениях. В то же

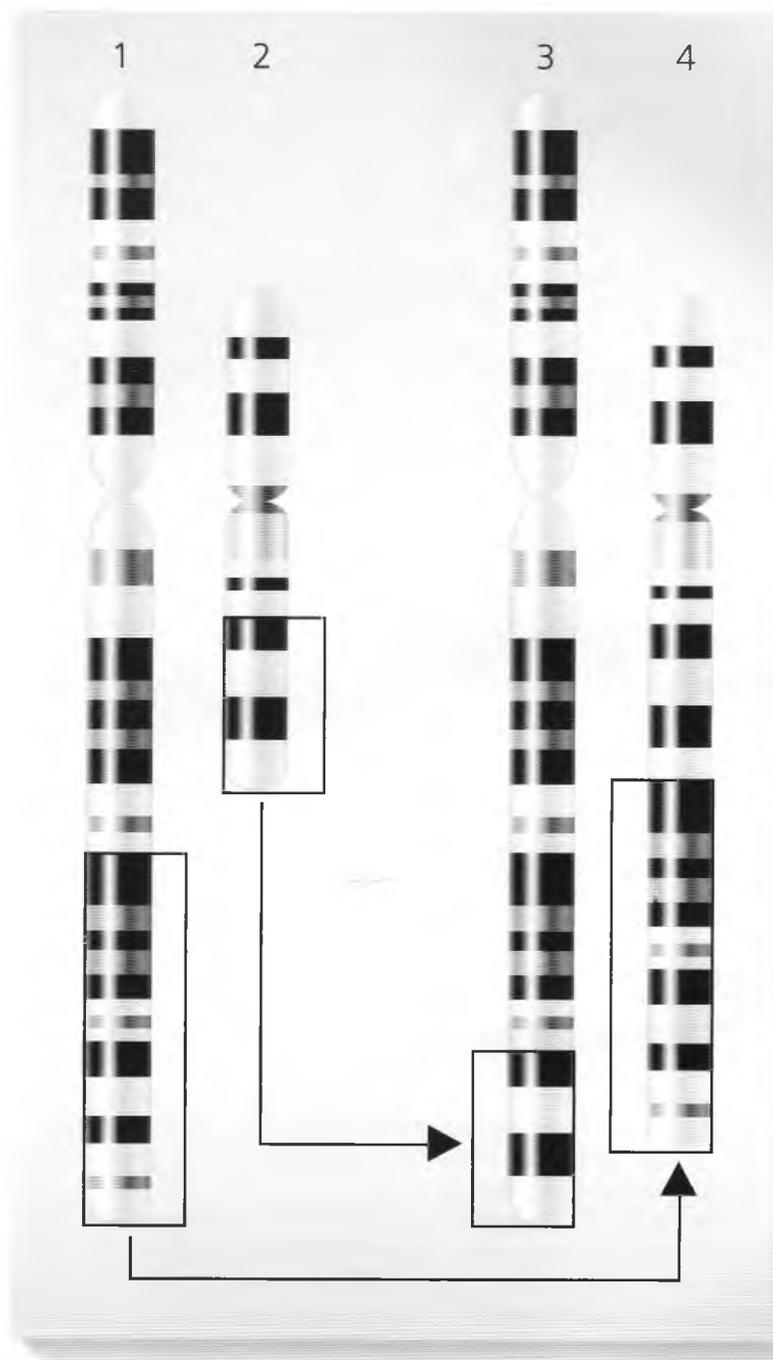


Рис. 1.29. Механизм образования реципрокной транслокации. Схема:
1 – хромосома 7; 2 – хромосома 16; 3 – дериват хромосомы 7;
4 – дериват хромосомы 16.

время, у женщин, носительниц робертсоновских транслокаций, может происходить прерывание беременности на ранних сроках в связи с наличием несбалансированного кариотипа у плода. Для мужчин, носителей аналогичных транслокаций, характерно нарушение сперматогенеза и бесплодие. Также у носителей робертсо-

новских транслокаций могут рождаться дети с хромосомными аномалиями.

Реципрокные транслокации представляют собой обмен хромосомным материалом за счет разрыва в двух или более хромосомах и воссоединения хромосомного материала в новых комбинациях с сохранением постоянного числа хромо-

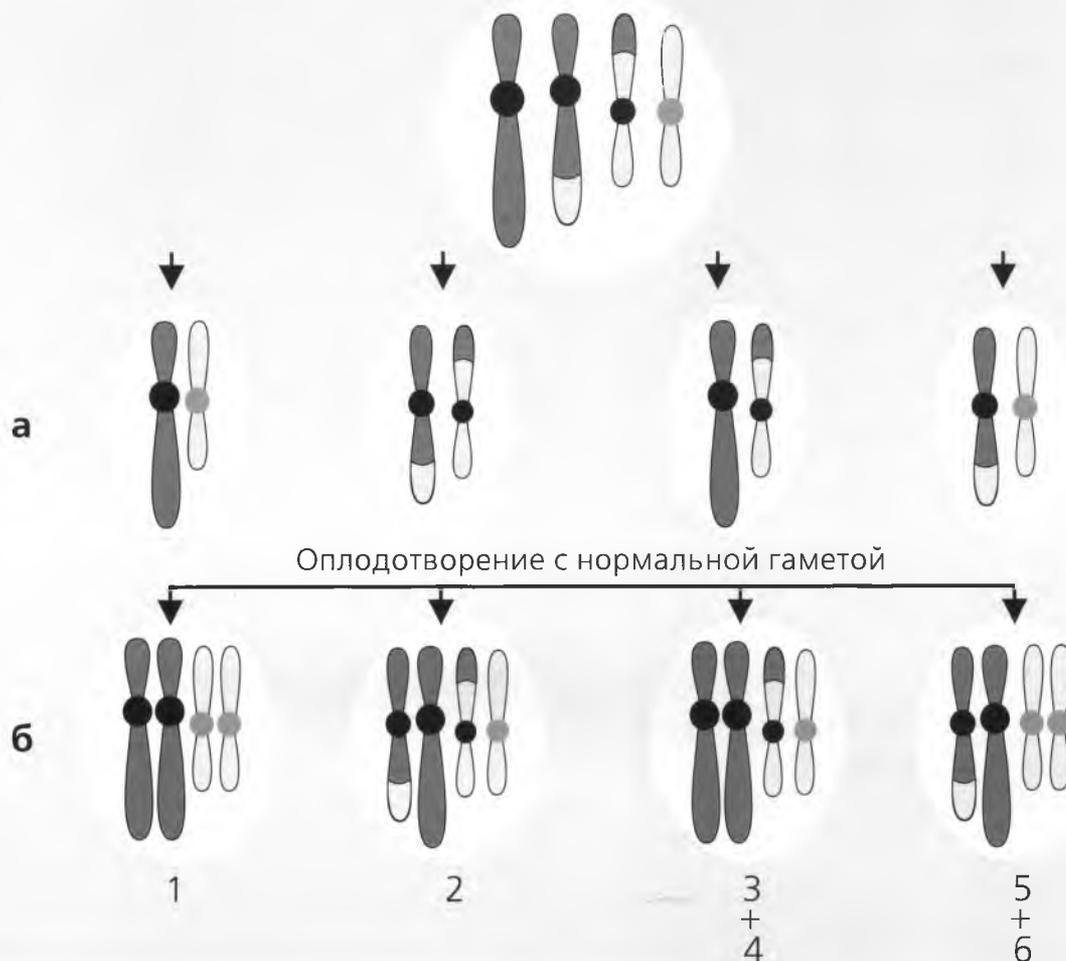


Рис. 1.30. Варианты хромосомного набора у детей, один из родителей которых является носителем сбалансированной транслокации: варианты гамет (а), варианты зигот после оплодотворения с нормальной гаметой (б). Схема:

- 1 – нормальный кариотип; 2 – сбалансированный кариотип;
 3 – частичная трисомия; 4 – частичная моносомия;
 5 – частичная моносомия; 6 – частичная трисомия.

сом (рис. 1.29) (фото 1.15).

Общепопуляционная частота выявления реципрокных транслокаций составляет 0,2%: среди супружеских пар с бесплодием – 0,6%, среди пар, прошедших более 10 циклов IVF, – 3,2%, среди пар с тремя и более спонтанными абортами в анамнезе – 9,2%, среди мужчин с бесплодием, для которых применяют технологию ICSI, – 2-3,2% (Munne, 2001).

В большинстве случаев носители сбалансированных реципрокных транслокаций здоровы, однако для их потомков харак-

терен высокий риск наличия несбалансированного кариотипа (рис. 1.30).

В отдельных случаях носители сбалансированного кариотипа имеют различные врожденные пороки или микроаномалии развития, а также нарушения нервно-психического развития (Wenger et al., 1995). Появление аномального фенотипа объясняется разрывом в гене или его исключением из функционально значимого окружения (эффект положения генов). Риск рождения ребенка с несбалансированной транслокацией для родителей, носителей реципрокных транслокаций, варьирует в

зависимости от хромосомы и локализации точек разрыва при формировании транслокации (Midro et al., 1992; Faraut et al., 2000; Rothlisberger et al., 2000). Идентификацию и уточнение точек разрыва при сбалансированных и несбалансированных транслокациях проводят с помощью молекулярно-цитогенетических методов (FISH и ее модификации).

Среди реципрокных транслокаций наиболее часто выявляют транслокацию между хромосомами 11 и 22 – $t(11;22)(q23;q11)$ (фото 1.15д). Для мужчин, носителей такой транслокации, характерно нарушение сперматогенеза и бесплодие. У женщин с аналогичной транслокацией происходят выкидыши либо рождаются дети с частичной трисомией хромосомы 11 – $dup(11)(q23 \rightarrow qter)$ или хромосомы 22 – $dup(22)(pter \rightarrow q11)$. Частичная трисомия хромосомы 22 (кариотип 47,XX или XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11)) встречается чаще, возникая в результате первой мейотической сегрегации 3:1 у одного из родителей (Armstrong et al., 2000).

Отдельный класс хромосомных перестроек составляют абберрации, в которых принимают участие терминальные участки хромосом – теломеры. Данный тип хромосомных абберраций возможно выявить только с помощью молекулярно-цитогенетических методов. Этот класс называют субтеломерными или теломерными делециями. Кроме указанных абберраций, существуют и скрытые субмикроскопические субтеломерные хромосомные аномалии, которые выявляют у 7,4% детей с разной степенью умственной отсталости, от средней до тяжелой, и у 0,5% населения с легкими формами умственной отсталости неизвестной этиологии (De Vries et al., 2001).

1.8.2. Диагностика хромосомных аномалий

Исследование хромосомных аномалий основывается на проведении цитогенетического анализа дифференциально окрашенных мета- и прометафазных хромосом с применением микроскопической техники. С момента выявления первых

хромосомных патологий (трисомия хромосомы 21 при синдроме Дауна, аномалии количества половых хромосом при синдромах Шерешевского–Тернера и Клайнфельтера) прошло 50 лет. За это время описаны различные типы хромосомных аномалий, разработаны и усовершенствованы методы получения и анализа хромосом в гаметах, клетках амниотической жидкости и ворсин хориона, фибробластах кожи и лимфоцитах периферической крови, клетках опухолей. Полученная информация требовала систематизации, что способствовало разработке и созданию сначала рекомендаций по номенклатуре хромосом человека в 1971 г., а затем непосредственно номенклатуры хромосом в 1978 г. Изданные в последующие годы номенклатуры отражают развитие цитогенетических методов, а последняя учитывает достижения молекулярно-цитогенетических методов в практике цитогенетического анализа (ISCN, 2005).

Использование различных методов дифференциального окрашивания и анализ ранних прометафаз позволяют выявлять хромосомные аномалии в пределах 5-10 млн п.н. Изменения, возникшие в пределах от одного до нескольких млн п.н. ДНК, выявить сложно или невозможно. Нерешенной проблемой остается также идентификация хромосомных изменений с неопределенной сегментацией (маркерные хромосомы, новые несбалансированные транслокации и микроструктурные аномалии).

С середины 80-х гг. XX ст. в практику цитогенетических лабораторий начинают внедрять молекулярно-цитогенетические методы, а именно метод гибридизации *in situ*, сначала с использованием радиоактивно меченных ДНК зондов, а позже – флюоресцентно меченных (FISH) (Ю.Б. Юров, 1984; Cremer et al., 1986; Soloviev et al., 1995a; Pinkel et al., 1986; Vorsanova et al., 1986, 1990, 1994; Ried et al., 1998). Указанная технология дает уникальную возможность одновременно оценить молекулярную и цитогенетическую информацию, в частности, позволяет картировать ген на хромосоме, выявлять и идентифицировать хромосомные аномалии, которые произошли в пределах от одного

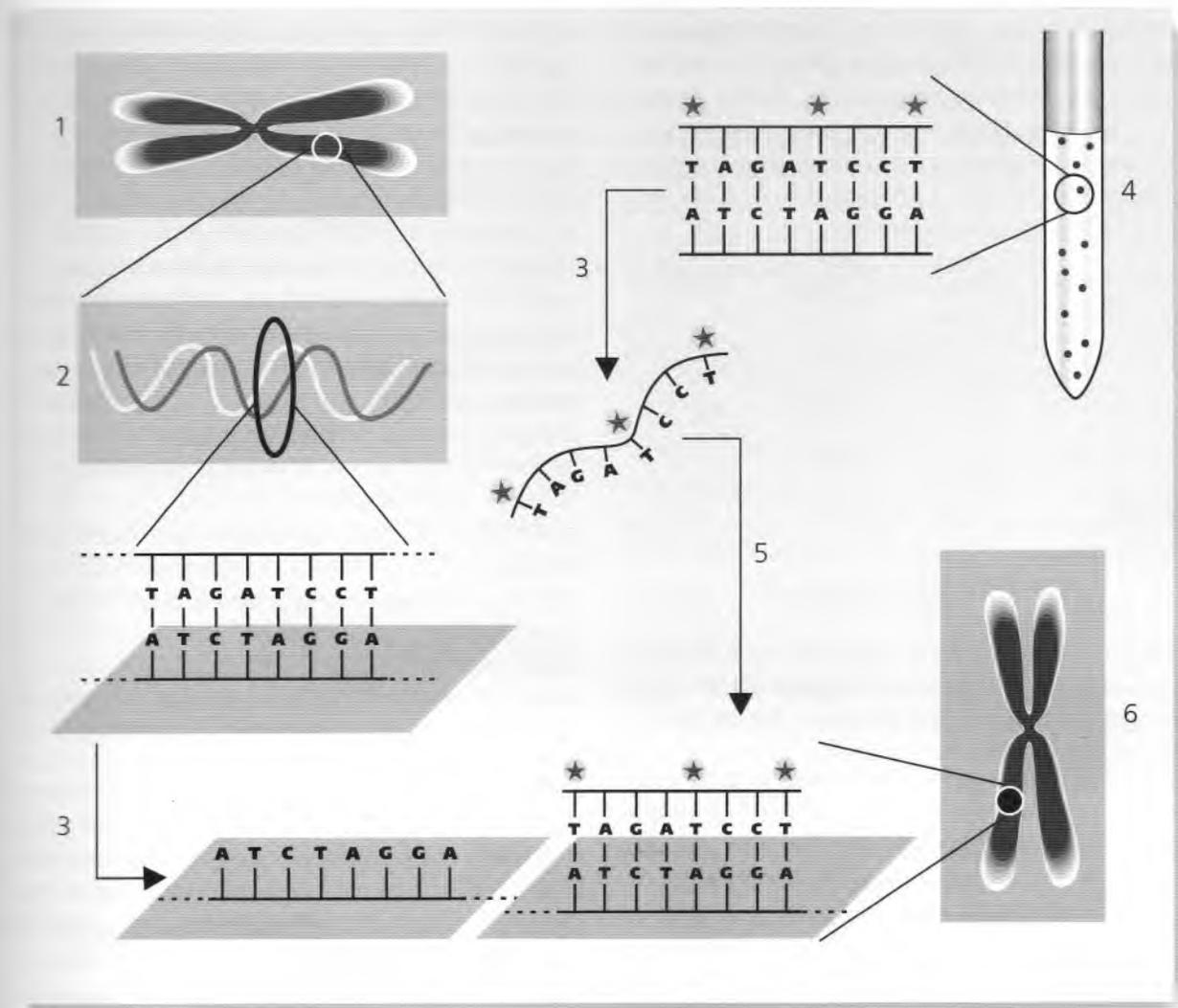


Рис. 1.31. Принцип метода FISH. Схема:

- 1 – хромосома на препарате; 2 – нить ДНК;
- 3 – процесс денатурации;
- 4 – ДНК зонд;
- 5 – процесс гибридизации зонда с комплементарным участком денатурированной хромосомы;
- 6 – визуализация сигнала на хромосоме.

до нескольких млн п.н. ДНК, проводить анализ на отдельно взятых клетках – интерфазных ядрах, бластомерах, выявлять новые структурные перестройки хромосом, в том числе идентифицировать дополнительные маркерные хромосомы.

Метод гибридизации *in situ* представляет собой вид молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, при которой одним компонентом гибридизации выступает ДНК фиксированного материала (ДНК ме-

тафазных хромосом или ядер), а вторым – комплементарная ей последовательность ДНК, меченная радиоактивными изотопами (H^3) или флюорохромами, – ДНК зонд (рис. 1.31).

Перед проведением реакции гибридизации проводят денатурацию ДНК зонда и исследуемого материала, что позволяет зонду связаться с комплементарными последовательностями в исследуемом материале. Процесс гибридизации зани-

мает от 3 до 18 ч. После гибридизации производят процедуру постгибридизационной отмычки – удаление несвязанного (избыточного) ДНК зонда. Места локализации последовательностей ДНК, комплементарных ДНК зонду, визуализируют под микроскопом с применением специальных фильтров, специфичных для использованных красителей.

В настоящее время выявление и идентификацию хромосомных аномалий с применением FISH осуществляют с помощью многочисленных разнообразных хромосомоспецифичных ДНК проб. Различают следующие типы ДНК зондов: локус-специфичные зонды, хромосомоспецифичные ДНК зонды (альфоидные ДНК зонды и "классические" сателлитные ДНК зонды), хромосомоспецифичные ДНК зонды для целых хромосом, ДНК зонды на теломерные участки хромосом. Варианты использования различных типов ДНК зондов представлены на **фото 1.16-1.18**.

В последнее время основными направлениями в молекулярно-цитогенетической диагностике хромосомной патологии являются создание новых ДНК зондов, усовершенствование и разработка новых модификаций визуализации зонда в исследуемом объекте, чему способствует стремительное развитие технологий регистрации сигнала, цифровой записи микроскопических изображений и их компьютерной обработки (И.Ю. Юров и др., 2005; С.Г. Ворсанова и др., 2006, 2008). Современные разработки позволяют в исследуемой клетке визуализировать одновременно 22 пары аутосом и гоносомы. В практику цитогенетических лабораторий внедрены коммерческие программы, обеспечивающие наряду с классическим цитогенетическим анализом препаратов проведение анализа результатов FISH или ее модификаций. Применяют одно-, двух-, трех-, пяти- и многоцветовую флюоресцентную диагностику (1-, 2-, 3-, 5-colour, multi-colour chromosome painting) хромосомных аномалий.

Многоцветовая FISH представляет собой кариотипирующую технологию с использованием хромосомоспецифичных ДНК зондов всех хромосом человека и их од-

новременной визуализацией, что позволяет выявлять хромосомные перестройки, идентифицировать маркерные хромосомы в пре- и постнатальной диагностике, а также в онкоцитогенетике (Т.Э. Зерова-Любимова и др., 2005) (**фото 1.19-1.21**). Указанная технология включает спектральное кариотипирование (SKY) и 24-цветовую FISH. В основе спектрального кариотипирования лежит использование интерферометрии (спектроскопии Фуулера) с программным обеспечением, включающим алгоритм оценки спектральных характеристик каждой хромосомы. В 24-цветовой FISH используют набор оптических фильтров для отдельной регистрации сигналов каждого из пяти флуорохромов с последующей компьютерной обработкой, которая позволяет сложить пять изображений в суммарный образ, в результате чего каждая хромосома приобретает собственный псевдоцвет, основанный на сочетаниях флуорохромных красителей (Saracoglu et al., 2001).

Диагностика хромосомной патологии с помощью FISH проводится на половых клетках, отдельных бластомерах для преимплантационной диагностики, на интерфазных ядрах и метафазах, полученных из биоптата ворсин хориона, или амниоцитах в пренатальной диагностике, а также интерфазных ядрах и метафазах, полученных из лимфоцитов периферической крови. Выявление анеуплоидии, а также мозаицизма имеет большое значение для пренатальной диагностики хромосомной патологии. За последнее десятилетие практика использования FISH на некультивируемых интерфазных клетках приобрела широкое применение в пренатальной диагностике наиболее распространенных ауто- и гоносомных анеуплоидий. Благодаря FISH появилась возможность получать достоверную информацию о мозаицизме плода и выявлять псевдомозаицизм, обусловленный наличием в материале материнских клеток. Применение меченных различными флуорохромами ДНК зондов позволяет проводить одновременную оценку наличия анеуплоидии хромосом (13, 16, 18, 21, 22, X и Y). В практике постнатальной диагностики хромосомной патологии именно

благодаря применению FISH стало возможно выявлять субмикроскопические или скрытые транслокации, которые сопровождают целый ряд наследственных синдромов. Указанный метод позволяет идентифицировать дополнительные маркерные хромосомы, устанавливать точное соотношение различных клонов клеток при мозаичных вариантах хромосомной патологии, а также проводить определение специфических и неспецифических хромосомных аномалий в делящихся и неделящихся опухолевых клетках (Greulich et al., 2000; Liehr et al., 2004; Crolla et al., 2005; Vorsanova et al., 1994, 2000, 2005).

Помимо FISH, для диагностики хромосомной патологии используют следующие молекулярно-цитогенетические технологии:

- хромосомную супрессию *in situ* (CISH hybridization), которая позволяет использовать совокупность уникальных последовательностей на целой хромосоме или ее участке;
- FISH с применением микродиссекции хромосомного материала;
- метод PRINS (реакция амплификации проводится непосредственно на исследуемых препаратах с использованием меченых нуклеотидов, продукты амплификации гибридизируют с мечеными нуклеотидами и выявляют комплементарные им участки ДНК непосредственно на хромосомах);
- сравнительную геномную гибридизацию.

Среди указанных методов в настоящее время все большую популярность приобретает метод сравнительной геномной гибридизации (CGH) (Н.В. Островерхова и др., 2002а,б; С.Г. Ворсанова и др., 2008; Tachdjian et al., 2000; Barrett et al., 2001). CGH была разработана в 1992 г. и успешно использована в молекулярно-цитогенетической идентификации хромосомных аномалий, возникающих при онкологических заболеваниях (Kallioniemi et al., 1992). В основе этого метода лежит сравнение профиля изменений количества копий каждого локуса в исследуемом и контрольном образцах, меченных разными флюорохромами, на метафазах контрольного материала. Изменение соотно-

шения интенсивности флюоресцентного свечения, маркирующего нормальную и анализируемую ДНК, указывает на увеличение или уменьшение числа копий ДНК в исследуемом материале. С помощью метода сравнительной гибридизации в пределах одного эксперимента выявляют различные хромосомные перестройки: делеции, инсерции, дупликации. В связи с возможностями этого метода устанавливается анеуплоидия на уровне сегмента был предложен термин "профилирование сегментной анеуплоидии" (SAP) (Hochstenbach et al., 2006). В настоящее время CGH применяется в пре- и постнатальной диагностике хромосомной патологии (Wells and Levy, 2003; Hochstenbach et al., 2006).

1.8.3. Генные мутации

Любой ген может существовать в виде различных вариантов – аллелей. Аллели различаются между собой по составу нуклеотидов в определенных ограниченных участках ДНК. Количество аллелей одного гена может составлять от 2-3 до нескольких десятков. Различные аллели могут проявляться в разных вариантах: доминантном, рецессивном и кодоминантном.

Мутации приводят к возникновению новых аллелей соответствующих генов и лежат в основе генетической изменчивости в живой природе. В одних случаях мутации нейтральны и рассматриваются как нормальный полиморфизм, они не элиминируются отбором и встречаются в популяции с достаточно высокой частотой. Такие мутации не влекут каких-либо фенотипических последствий, например, при их локализации в функционально незначимых областях молекулы ДНК. Изучение полиморфизма ДНК широко используется в генетической идентификации личности и целом ряде базовых методов молекулярно-генетического анализа.

В других случаях мутации приводят к нарушению механизма транскрипции/трансляции гена или к синтезу аномального белкового продукта. В литературе термин "мутация" используется при таких нарушениях структуры гена, которые имеют несомненное патогенетическое значение. Ген-

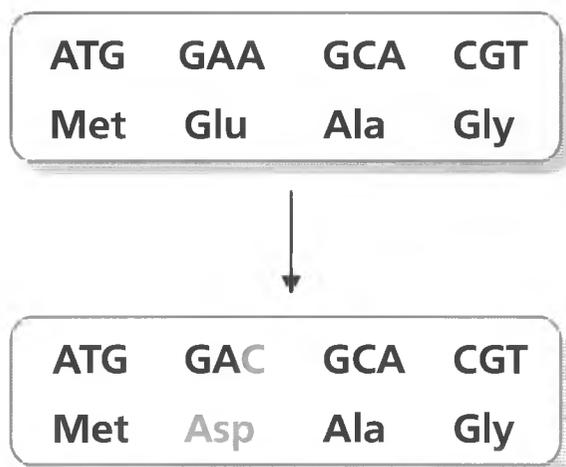


Рис. 1.32. Миссенс-мутация

ные мутации – устойчивые наследственные изменения в определенном участке молекулы ДНК, а именно в первичной нуклеотидной последовательности ДНК. Мутации могут происходить в различных участках гена: в его кодирующей части (экзонах), интронах и промоторах. Изменения в экзонах приводят к нарушению синтеза аминокислотной последовательности, мутации в промоторной части в основном нарушают уровень экспрессии гена. В зависимости от размера поврежденного участка ДНК различают внутригенные – точковые мутации (поражают один нуклеотид) – и межгенные – структурные мутации, охватывающие более протяженный участок молекулы ДНК.

К точковым мутациям относятся: замещение основания в данном положении другим основанием, замена оснований (транзиции и трансверсии), вставка или удаление одного или нескольких оснований, перестановка оснований.

Среди точковых мутаций чаще всего встречаются нуклеотидные замены в кодирующей области гена, т. е. в экзонах. Замена

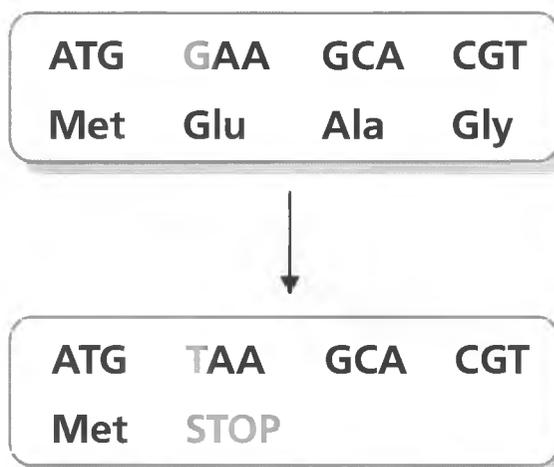


Рис. 1.33. Нонсенс-мутация

основания приводит к таким изменениям образованного кодона, как сохранение смысла кодона, изменение смысла кодона (миссенс-мутация), образование бессмысленного кодона с преждевременной терминацией (нонсенс-мутация). Если нуклеотидная замена сопровождается изменением аминокислотного шифра соответствующего кодона, мутация ведет к изменению состава полипептидной цепи вследствие встраивания в нее "ошибочной" аминокислоты. Мутации данного типа называются миссенс-мутациями (missence – с изменением "смысла" поврежденного кодона) (рис. 1.32).

Степень тяжести фенотипических проявлений болезни в этом случае будет определяться функциональной значимостью мутантного участка белка. Наиболее тяжелые последствия обычно влекут миссенс-мутации, затрагивающие активные центры белковой молекулы. Иногда нуклеотидная замена приводит к замене информационно значимого кодона на стоп-кодон (UAA, UAG, UGA), что обуславливает преждевременный обрыв трансляции и образование "усеченной" (truncated),

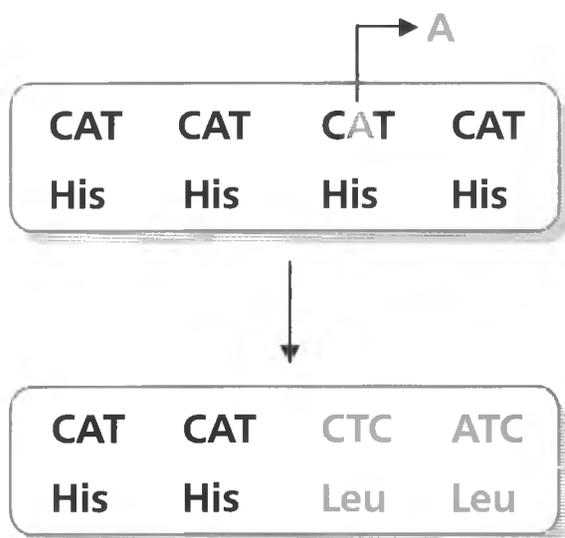


Рис. 1.34. Делеция нуклеотида

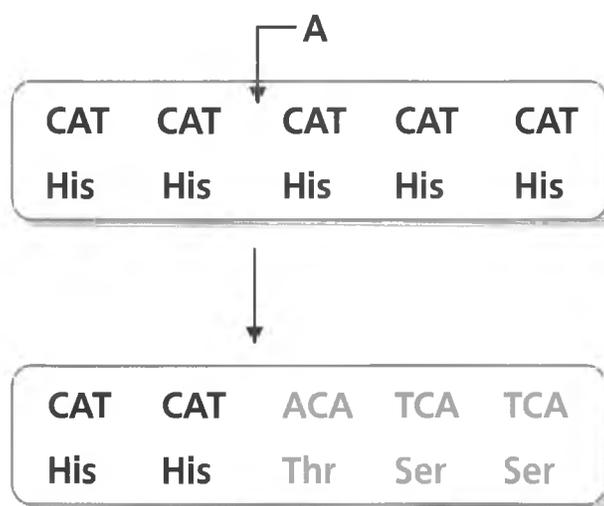


Рис. 1.35. Инсерция нуклеотида

функционально дефектной молекулы белка. Такие нуклеотидные замены обозначаются термином нонсенс-мутации (nonsense – "бессмысленные", нарушающие информационную роль кодона) (рис. 1.33).

Достаточно распространенным типом мутантных аллелей являются аллели, образующиеся в результате делеции (выпадения) или инсерции (вставки) нуклеотидов в кодирующей области гена (рис. 1.34 и 1.35).

Если число нуклеотидов при делециях и вставках не кратно трем (например, в случае точковой мутации с выпадением одного нуклеотида), такая мутация приводит к нарушению нормального отсчета кодирующих триплетов, и все последующие кодоны в полинуклеотидной цепи приобретают другой аминокислотный смысл. Такой тип мутаций сопровождается сдвигом рамки считывания генетического кода (frameshift); мутации со сдвигом рамки считывания ведут к синтезу "бессмысленного" чужеродного белка (рис. 1.36).

Мутации со сдвигом рамки считывания и нонсенс-мутации, расположенные в 5'-области гена, сопровождаются отсутствием синтеза с данной копии гена сколько-нибудь значимой в функциональном отношении полипептидной молекулы и полной потерей активности белка. Такие мутации нередко несовместимы с жизнью или характеризуются развитием выраженных мультисистемных проявлений болезни. Точковые и структурные мутации могут происходить не в собственно кодирующих участках гена, а на самом стыке экзонов и интронов – в сайтах сплайсинга (сплайсинговые мутации). Такие мутации нарушают нормальные механизмы созревания первичного РНК-транскрипта и приводят к неправильному вырезанию интрона либо удалению из молекулы РНК информационно значимой экзонной последовательности с последующим значительным нарушением структуры белка, ведущим к развитию тяжелых клинических проявлений болезни. В редких случаях мутации могут затрагивать различные регуляторные последовательности (например, в области промотора или интронов),

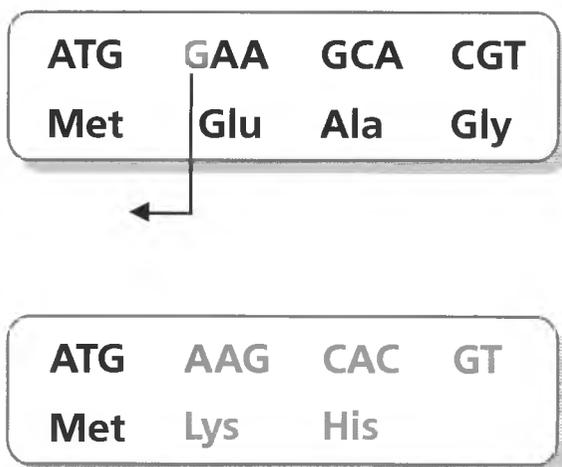


Рис. 1.36. Мутация со сдвигом рамки считывания

влияющие на характер экспрессии гена. Такие регуляторные мутации обычно сопровождаются не нарушением структуры или функции белковой молекулы, а количественными изменениями содержания белка в клетке.

В последнее десятилетие был описан новый тип мутаций – динамические мутации (или мутации по типу экспансии tandemных тринуклеотидных повторов ДНК) (**рис. 1.37**).

Динамическая мутация, или экспансия ДНК, представляет собой увеличение числа копий коротких повторяющихся последовательностей нуклеотидов внутри кластера при передаче генетической информации от родителей потомкам (Richards and Sutherland, 1992). Удлиненный участок гена при динамических мутациях нестабилен, и в ряду поколений число повторов увеличивается (**рис. 1.38**).

По своему патогенетическому механизму все мутации, вызывающие развитие наследственных заболеваний, подразделяют на пять основных групп:

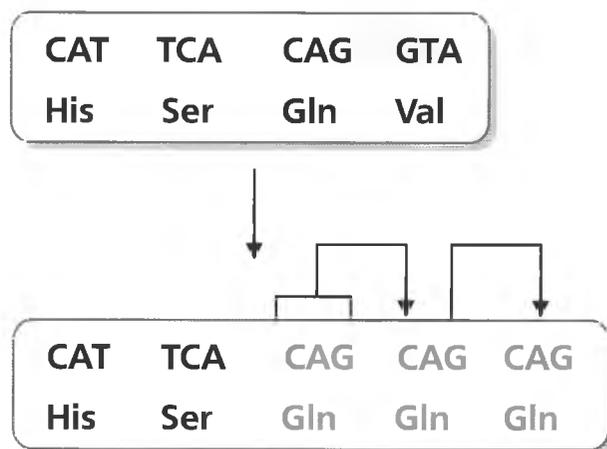


Рис. 1.37. Мутация по типу экспансии tandemных тринуклеотидных повторов

1) Мутации, ведущие к потере функции (loss-of-function). К указанной группе относятся любые структурные изменения генов (точковые мутации, делеции, экспансия тринуклеотидных повторов в некодирующих областях генов и др.), приводящие к ингибированию процессов транскрипции/трансляции или нарушению нормальной структуры и функциональных свойств белка.

2) Мутации, ведущие к появлению новой функции (gain-of-function). Данный тип мутаций, не затрагивая нормальной функции белка, вызывает появление у мутантного белка новых свойств. Такой механизм характерен для аутосомно-доминантных болезней, обусловленных экспансией CAG-повторов в транслируемой области гена: удлинение полиглутаминовых участков в составе мутантных белковых молекул сопровождается образованием необратимых межмолекулярных "сшивок" и формированием токсичных внутриклеточных полимерных комплексов.

3) Мутации, обладающие доминантным негативным эффектом (dominant negative effect), который проявляется в том

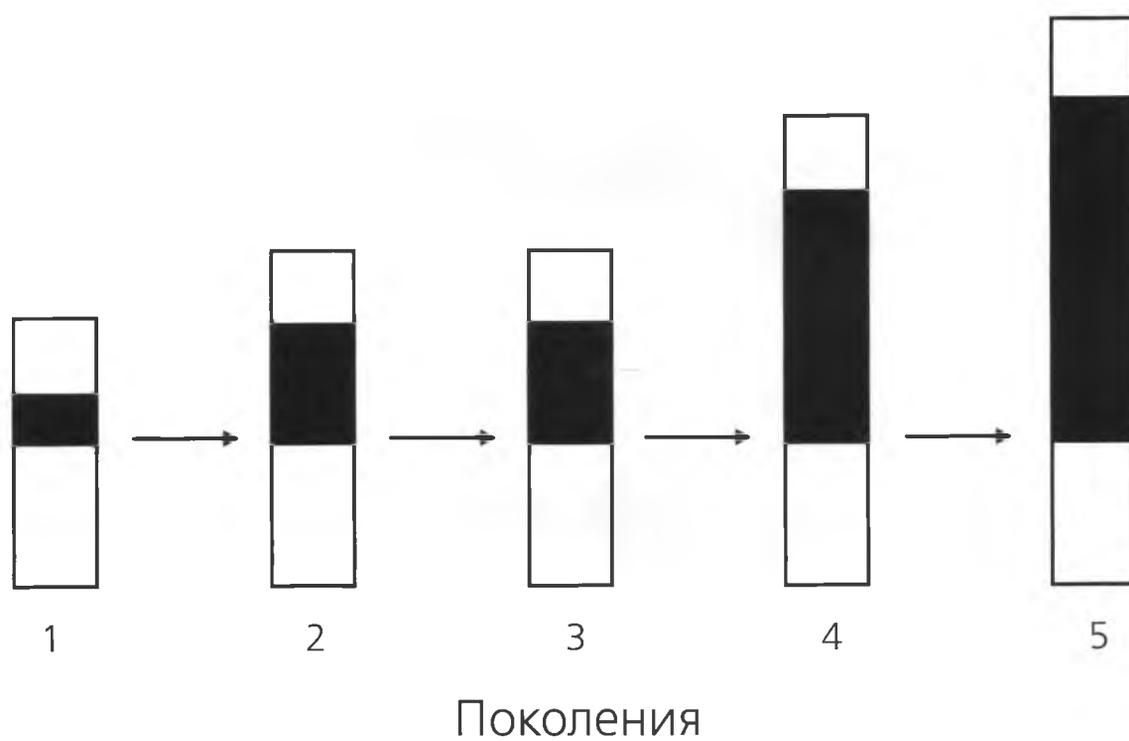


Рис. 1.38. Накопление динамической мутации в ряду поколений

Таблица 1.6. Заболевания, связанные с динамическими мутациями

Патологическое состояние	Локализация гена на хромосоме	Тринуклеотидный повтор	Количество повторов	
			Норма	Болезнь
Синдром ломкой хромосомы X (синдром Мартина–Белл)	Xq27.3	CGG или CCG	<45	>200
Спинально–бульбарная мышечная атрофия	Xq11-12	CAG	17–26	40–52
Миотоническая дистрофия	19q13.3	CTG	5–27	50–1600
Хорея Гентингтона	4p16.3	CAG	11–34	>42
Спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа	6p21.3	CAG	25–36	43–81
Атаксия Фридрейха	9p13	GAA	7–22	291–900

случае, если продукт мутантного аллеля ингибирует функцию нормальных белковых молекул.

4) Мутации, изменяющие "дозу гена" (gene dosage effect). Нарушение "дозы гена" проявляется при его делециях или дупликациях, что может сопровождаться нарушением нормальной цитоархитектоники соответствующего молекулярного продукта.

5) Мутации, обуславливающие количественные изменения первичных молекулярных продуктов гена (мРНК и белка). Такой механизм наблюдается обычно при локализации мутаций в регуляторных областях генов.

При всех заболеваниях, обусловленных динамическими мутациями, тяжесть клинических проявлений прямо пропорционально коррелирует с величиной экспансии тринуклеотидных повторов, т.е. со степенью тяжести генетического дефекта. Динамический характер мутаций и тенденция к нарастанию числа повторов при передаче гена являются молекулярной основой феномена антиципации, свойственного доминантным "тринуклеотидным" заболеваниям и заключающегося в появлении все более раннего и тяжелого проявления болезни в каждом последующем поколении. В табл. 1.6. представлены наиболее изученные заболевания, связанные с динамическими мутациями.

Большинство заболеваний, возникаю-

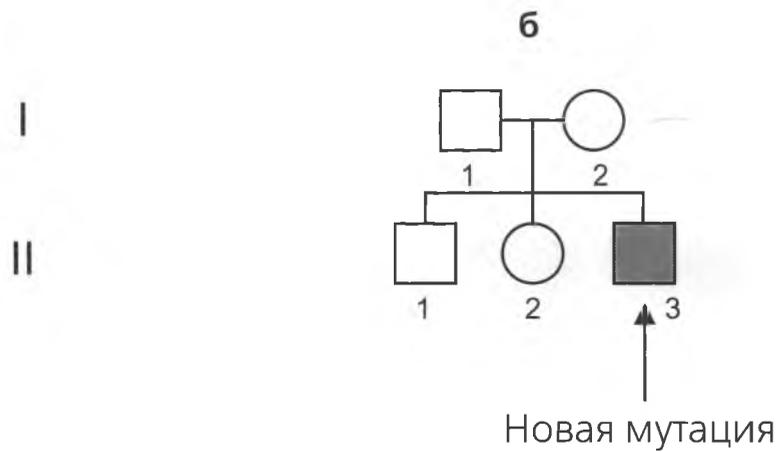
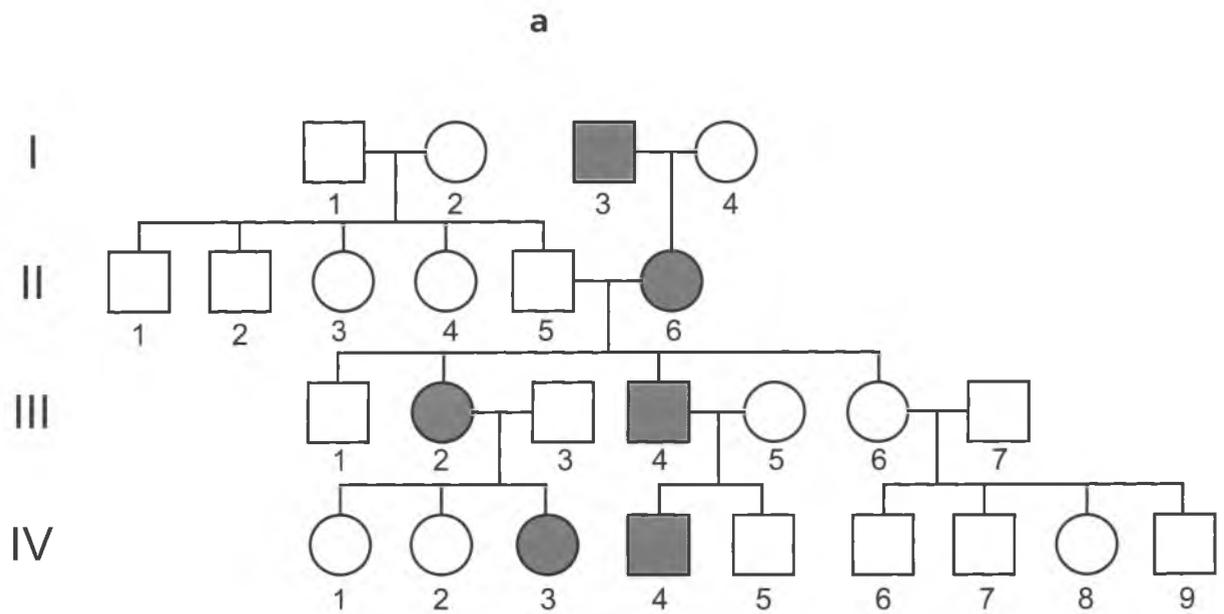
щих в результате точковой мутации, передаются согласно менделевскому типу наследования (аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному, X-сцепленному). В случае доминантного синдрома мутантный ген проявляется в гомозиготном и гетерозиготном состоянии. Аутосомно-доминантные заболевания, обусловленные гомозиготным состоянием, в большинстве случаев летальны. Заболевание передается по вертикали: наследуется детьми от пораженных родителей, при этом болезнь поражает и мужчин, и женщин (рис. 1.39).

Дети гетерозиготного больного наследуют мутантный ген с вероятностью 50%. У здоровых детей больного родителя рождаются только здоровые дети. Степень проявления патологического состояния зависит от пенетрантности и экспрессивности поврежденного гена (см. терминологический словарь).

Аутосомно-рецессивные наследственные заболевания наблюдаются у детей здоровых родителей, гетерозиготных носителей мутантного гена. Патологическое состояние наследуется в семье по горизонтали (рис. 1.40).

Вероятность развития аутосомно-рецессивной патологии у ребенка следующая:

- если оба родителя гомозиготны по рецессивному гену – 100%;
- если один родитель гомозиготен, а второй гетерозиготен по рецессивному



Больные: мужчина, женщина.

 Здоровые: мужчина, женщина.

Рис. 1.39. Родословная семьи с аутосомно-доминантным наследованием патологии (а); вновь возникшая патология с аутосомно-доминантным типом наследования (б)

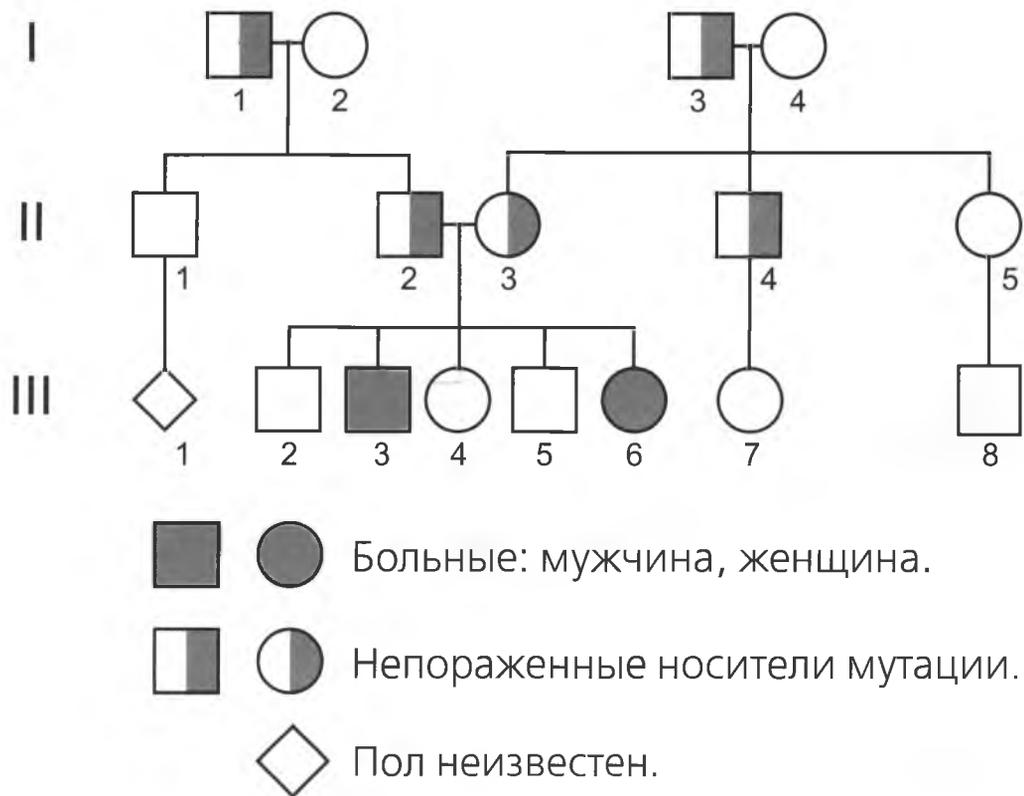


Рис. 1.40. Родословная семьи с аутосомно-рецессивным типом наследования

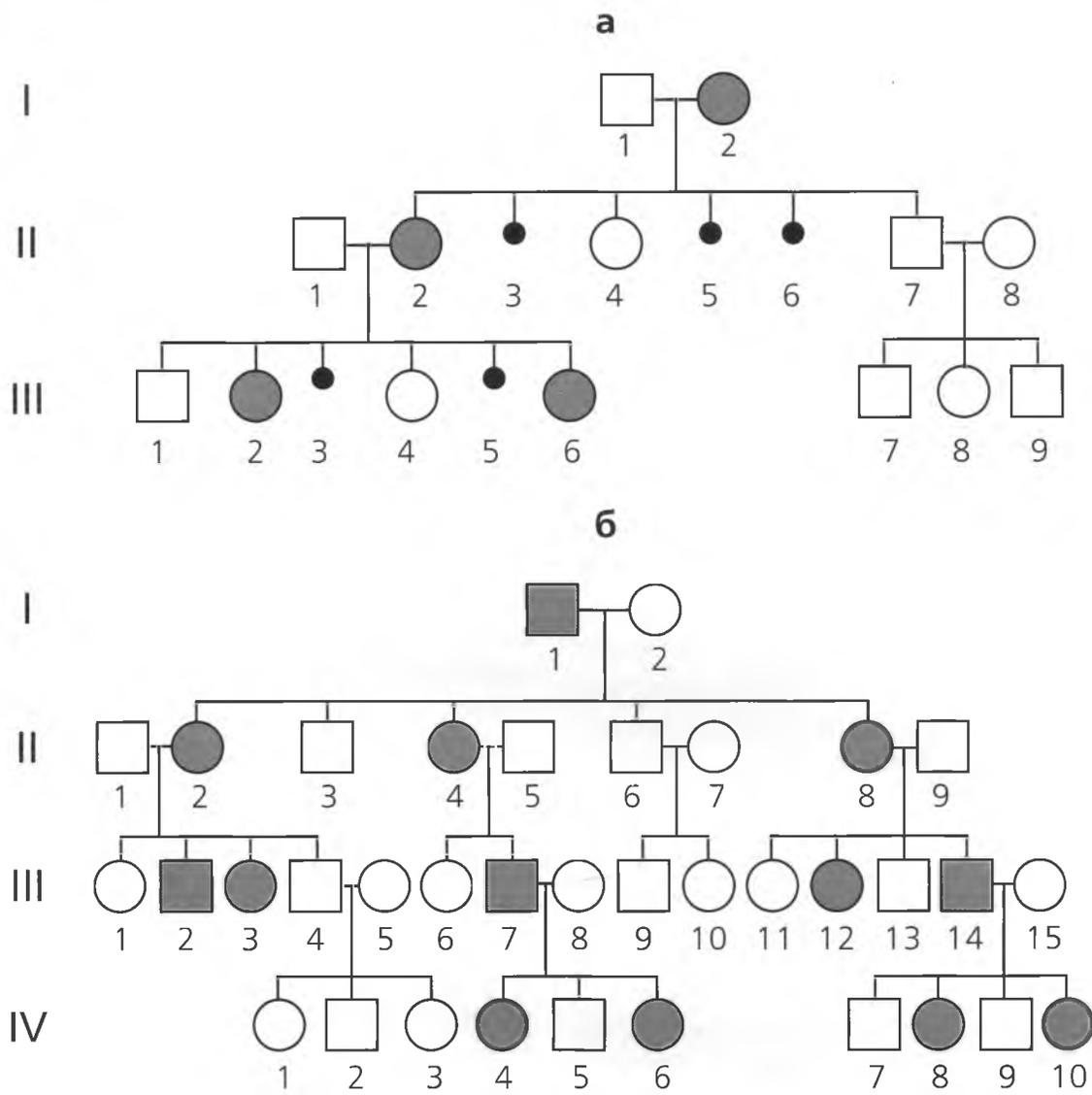


Рис. 1.41. Характер наследования X-сцепленной доминантной патологии при пораженной матери (а), пораженном отце (б)

гену – 50%;

- если оба родителя гетерозиготны по рецессивному гену – 25%.

X-сцепленная патология характеризуется развитием патологического состояния, обусловленного нарушением гена, который локализован на хромосоме X. Тяжесть заболевания зависит от пола: полное проявление болезни характерно для мужчин, так как они являются гемизиготами по генам, локализованным на хромосоме X. Для X-сцепленной патологии характерна невозможность передачи

патологического состояния от отца к сыну, так как сын наследует от отца хромосому Y, хромосому X – только от матери.

X-сцепленная доминантная патология проявляется как у женщин, так и у мужчин. У последних болезнь протекает тяжелее, чем у женщин, так как мужчины являются гемизиготами. X-сцепленное доминантное наследование характеризуется следующими особенностями (**рис. 1.41**):

- больная женщина с вероятностью 50% передает заболевание и сыновьям, и дочерям;

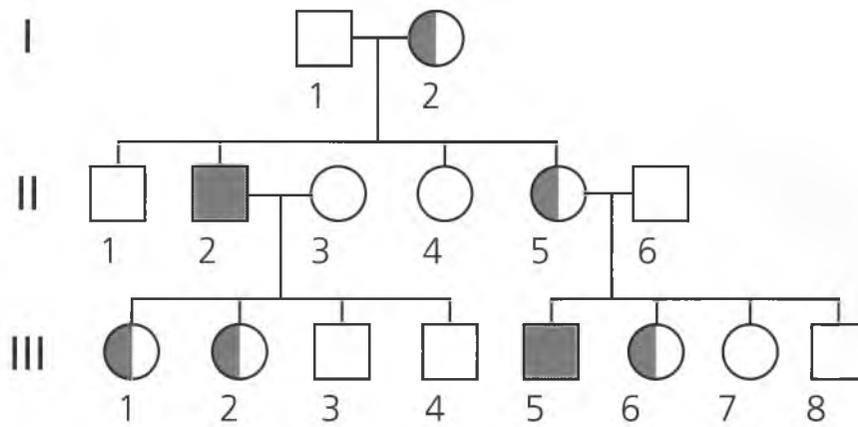


Рис. 1.42. Характер наследования X-сцепленной рецессивной патологии

- больной мужчина передает заболевание только всем дочерям;
- у женщин-гетерозигот болезнь протекает в более легкой форме, а ее признаки более изменчивы, чем у мужчин.

Характер наследования X-сцепленных рецессивных болезней более сложный (рис. 1.42):

- сыновья гетерозиготных женщин будут больны с вероятностью 50%;
- у больных мужчин все дочери гетерозиготны, а все сыновья здоровы;
- у здоровых мужчин мутантного гена нет, и все их дети здоровы;
- у больных гомозиготных женщин всегда болен отец, а мать гетерозиготна.

Y-сцепленная патология была описана сравнительно недавно. Длительное время считалось, что хромосома Y содержит только гетерохроматин. В настоящее время картированы гены хромосомы Y, принимающие участие в детерминации развития яичек, отвечающие за сперматогенез, контролирующие интенсивность роста организма, конечностей, зубов. Для Y-сцепленной патологии характерны следующие особенности: признак передается всем мальчикам; патологические мутации генов, отвечающих за формирование яичек или сперматогенез, наследоваться не могут, так как в таком случае индивиды бесплодны (рис. 1.43).

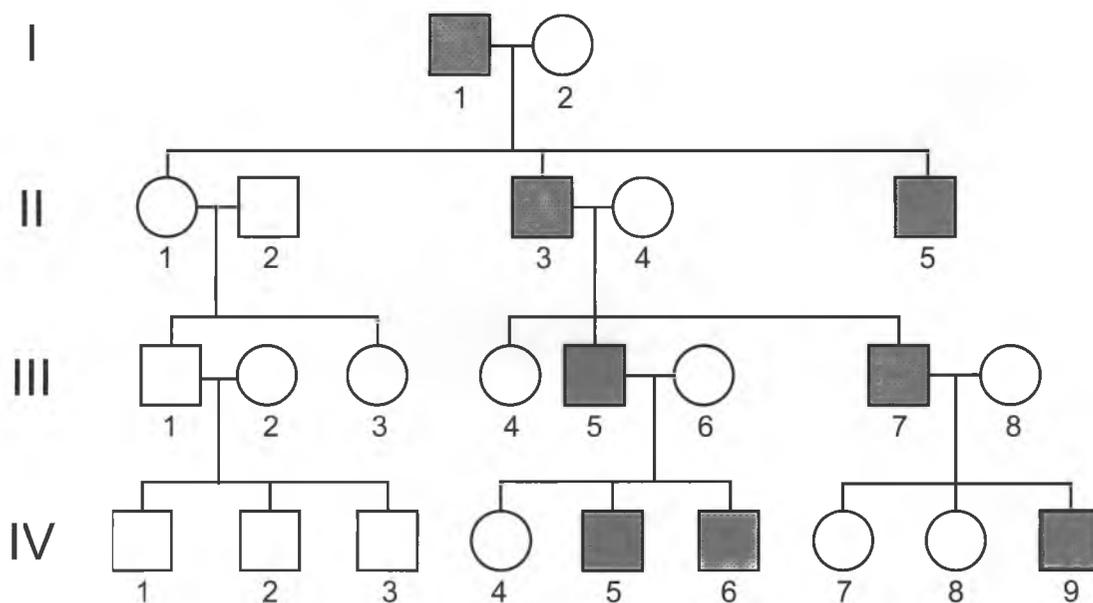


Рис. 1.43. Характер наследования Y-сцепленной патологии

1.8.4. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания

Помимо ядерной ДНК, существует митохондриальная ДНК, наследование которой существенно отличается от ядерной. Как известно, митохондрии содержат свою кольцевую хромосому, в состав которой входит 16 569 оснований, мтДНК кодирует две рибосомные РНК, все транспортные РНК и 13 полипептидов (А.У. Игамбердиев, 2000). МтДНК реплицируется и транскрибируется полуавтономно от ядерной ДНК.

Митохондриальный геном кодирует 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи, в то время как ядерный геном кодирует большую часть белков митохондрий (около 70). Среди них переносчики электронов, митохондриальные транслоказы, компоненты транспорта белков в митохондрии, факторы, необходимые для транскрипции, трансляции и репликации мтДНК.

Как известно, митохондрии участвуют в энергетическом обмене клетки, их основная функция связана с окислением органических соединений и с использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии в синтезе молекул АТФ.

Любые нарушения митохондрий негативно отражаются на функционировании организма. Митохондриальные нарушения наследуются преимущественно по материнской линии, поскольку, несмотря на то, что митохондрии сперматозоида попадают в зрелый ооцит при оплодотворении, их действие блокируется в результате убиквитин-зависимого протеолиза. Для митохондриальной наследственности характерны следующие особенности: болезнь передается только от матери, больны девочки и мальчики, больные отцы не передают болезнь ни дочерям, ни сыновьям (**рис. 1.44**).

Как показали исследования последних лет, некоторые наследственные заболевания, связанные с дефектами митохондрий, проявляют менделевское расщепление, что обусловлено нарушениями генов ядерной ДНК хромосом, контролирующих

митохондриальные процессы.

Известны мутации в различных генах мтДНК: более сотни точковых мутаций, несколько сотен структурных перестроек, приводящих к митохондриальным заболеваниям. Среди них следует отметить такие мутации в мтДНК: смысловые замены в структурных генах; мутации в генах рибосомальных и транспортных РНК; структурные перестройки типа делеций, дупликаций, затрагивающие протяженные участки ДНК.

На экспрессию мтДНК в значительной мере влияют мутации в ядерных генах.

Передача митохондрий по материнской линии через поколения является генетической основой наследования определенных метаболических заболеваний у человека, которые могут быть тяжелыми или даже летальными. Установлено, что при митохондриальном наследовании возможны гомоплазмия и гетероплазмия. Явление гетероплазмии представляет собой наличие митохондрий с различными вариантами геномов: присутствует как мутантная, так и нормальная мтДНК. Гетероплазмия возникает при наличии в клетке (примордиальной половой клетке, оогонии, ооците или бластомере) двух или более митохондриальных геномов, что может приводить к нарушению функции мтДНК (например, репликации или окислительного фосфорилирования). До определенной степени гетероплазмия не является фактором, нарушающим функционирование клетки, тем не менее, указанное явление исследуется как одна из причин, обуславливающих возникновение бесплодия у человека (Reynier et al., 2001; Van Blerkom, 2004).

Диагностика митохондриальных болезней осуществляется с помощью ДНК-анализа. Известен целый ряд митохондриальных заболеваний с различным типом наследования. Отдельные из них представлены в **табл. 1.7**.

В настоящее время проводят исследования роли митохондрий в оплодотворении и дальнейшем развитии эмбрионов. Преждевременная остановка мейотического деления и, соответственно, отсут-

Таблица 1.7. Классификация митохондриальных заболеваний на основе типа наследования

Тип наследования	Тип дефекта ДНК	Заболевание	Номер заболевания в МIM
Материнский	Точковые мутации мтДНК	MELAS*	540000
		MERRF*	545000
		NARP-синдром*	551500
		Синдром Лебера	535000
Аутосомно-доминантный	Мутации в гене <i>SDHA</i> ** (5p15)	Дефицит комплекса II (сукцинат-КоQ-редуктаза)	252011
	Мутации в гене <i>ANT1</i> ** (4q35)	Прогрессирующая наружная офтальмоплегия с делециями мтДНК	609283
Аутосомно-рецессивный	Мутации в гене <i>PDHB</i> ** (3p13-q23)	Дефицит пируватдегидрогеназы	179060
	Мутации в гене <i>FH</i> ** (1q42.1)	Фумаровая ацидемия	606812
X-сцепленный	Мутации в гене <i>PDHA1</i> ** (Xp22.2-p22.1)	Дефицит пируватдегидрогеназы	300502
	Мутации в гене <i>ATP7A</i> ** (Xq12-q13)	Синдром Менкеса	309400
Возникает спорадически	Мажорные перестройки мтДНК	синдром Кернса–Сейра	530000
		синдром Пирсона	557000

- * **MELAS** (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) - митохондриальная энцефалопатия, лактатацидоз, инсулиноподобные эпизоды.
MERRF (myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers) - миоклонус-эпилепсия, "рваные красные волокна".
NARP-синдром (neuropathy, ataxia, and retinitis) - нейропатия, атаксия, пигментный ретинит.
- ** **ANT1** (solute carrier family 25 (mitochondrial carrier) member 4 (adenine nucleotide translocator-1, skeletal muscle)) (MIM 103220).
ATP7A (ATPase, Cu(2+)-transporting, alpha polypeptide) (MIM 300011).
FH (fumarate hydratase) (MIM 136850).
PDHA1 (pyruvate dehydrogenase, E1-alpha polypeptide-1) (MIM 300502).
PDHB (pyruvate dehydrogenase, E1beta polypeptide) (MIM 179060).
SDHA (succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein) (MIM 600857).

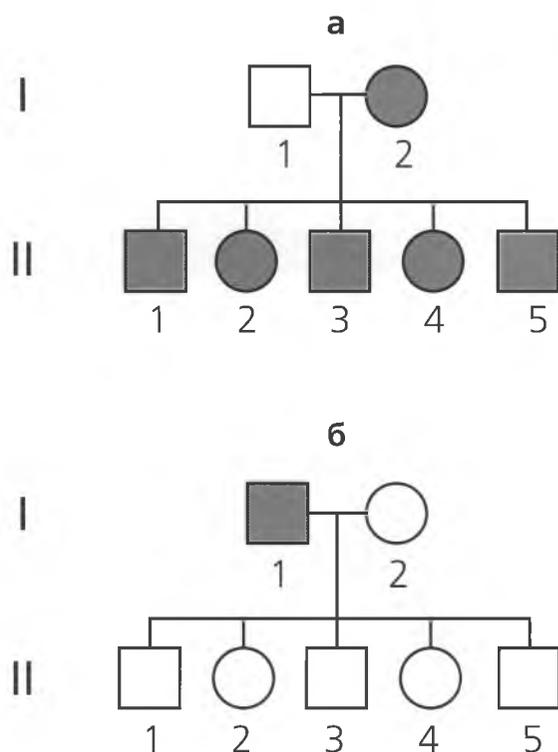


Рис. 1.44. Митохондриальный тип наследования: характер наследования митохондриальной патологии при пораженной матери (а); отсутствие митохондриальной патологии у детей при пораженном отце (б)

ствии оплодотворения напрямую связаны с малым количеством мтДНК (Reynier et al., 2001; Van Blerkom, 2004). Исследования на модельных системах (мышах) показали, что аномально высокий уровень митохондриального фосфорилирования приводит к нарушению дробления эмбрионов (Liu and Keefe, 2000). Результаты исследований на "лишних" эмбрионах, полученных в рамках программ вспомогательных репродуктивных технологий, показали, что неравномерное дробление может быть обусловлено непропорциональной митохондриальной сегрегацией в бластомерах, что приводит к остановке клеточного деления и лизису бластомеров (Van Blerkom et al., 2000, 2002). Выявлены структурные де-

фекты митохондрий, а также мутации в мтДНК. Соответственно, структурные, пространственные и генетические дефекты, нарушающие способность митохондрий продуцировать АТФ, могут оказывать плейотропное действие на презембрион – раннюю стадию развития организма человека (Dumollard et al., 2004).

Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о том, что потери эмбрионов в программах ВРТ являются результатом не только хромосомных аномалий ооцитов, но и тонких цитоплазматических дефектов, негативные последствия которых проявляются только после оплодотворения.

1.9. Современные базы данных наследственных заболеваний

Генетические факторы играют важную роль в развитии нарушения репродуктивной функции у человека. Выделяют нарушения, опосредованные мутацией одного из генов каскада гипоталамо-гипофизарно-гонадной регуляции, а также генов, участвующих в детерминации пола и половой дифференцировке. Наследование генетического дефекта происходит согласно общебиологическим законам наследственности (или законам Менделя). Менделирующие заболевания наследуются по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному и X-сцепленному типам. Определение типа наследования в каждом конкретном случае представляет собой серьезную генетическую задачу и проводится в рамках медико-генетического консультирования.

В настоящее время созданы базы данных наследственных заболеваний. Такие каталоги предоставляют исчерпывающую

информацию о каждом синдроме, гене, хромосоме человека. Один из ведущих каталогов, который называется "Менделирующая наследственность человека" (Mendelian Inheritance in Man, MIM), создан в 1966 г., к настоящему моменту переиздан десять раз (McKusick, 1966, 2007). С 1987 г. указанный каталог стал доступен в Интернете и получил название OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), ежедневно пополняясь новыми данными (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim). База данных содержит каталог аутосомно-доминантных, аутосомно-рецессивных, X-хромосомных, Y-хромосомных, митохондриальных генов (McKusick, 2007) (табл. 1.8). Каждый менделирующий признак имеет шестизначный номер, за названием признака и синонимами следует лаконичное описание болезни и ее патогенез, а также список наиболее важных источников литературы по данной теме.

Таблица 1.8. Характеристика базы данных MIM

№	Диапазон кодов MIM	Тип наследования
1	100000–199999	Аутосомно-доминантный (до 15 мая 1994 г.)*
2	200000–299999	Аутосомно-рецессивный (до 15 мая 1994 г.)*
3	300000–399999	X-сцепленный
4	400000–499999	Y-сцепленный
5	500000–599999	Митохондриальный
6	600000–	Аутосомный (после 15 мая 1994 г.)*

* Дата присвоения номера патологическому состоянию, обусловленному мутациями в аутосомах

1.10. Геномный импринтинг

Фенотипические проявления действия конкретного гена могут изменяться в связи с рассмотренными выше мутациями (точечная мутация, делеция гена и др.), а также в результате эпигенетических модификаций, механизм действия которых не подчиняется законам Менделя. Эпигенетическая изменчивость подразумевает изменение экспрессии генов без нарушения первичной последовательности нуклеотидов в ДНК или представляет собой модификацию генной экспрессии, обусловленную наследственными, но потенциально обратимыми изменениями в структуре хроматина и/или метилировании ДНК. В основе эпигенетической изменчивости лежит метилирование ДНК (геномный импринтинг) и модификации хроматина (ацетилирование гистонов, метилирование и фосфорилирование).

Процессы метилирования цитозина и деацетилирования гистонов сопряжены с конденсацией хроматина и, соответственно, с отсутствием экспрессии гена.

Геномный импринтинг относится к эпигенетическим феноменам и представляет собой процесс, во время которого происходит избирательная маркировка локусов хромосом одного из родителей, что влечет за собой выключение экспрессии генов, содержащихся в этом локусе. Другими словами, геномный импринтинг представляет собой эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в процессе индивидуального развития организма в зависимости от родительского происхождения гена, хромосомы, генома (**рис. 1.45**). В участке, подверженном импринтингу, наблюдается

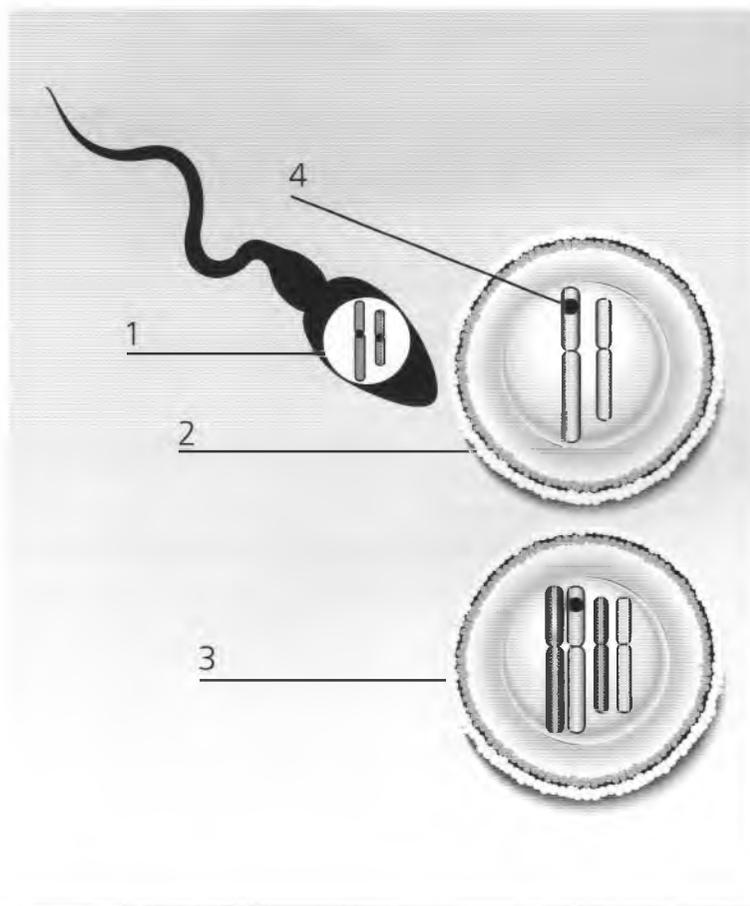


Рис. 1.45. Механизм импринтинга:

1 – сперматозоид; 2 – зрелый ооцит; 3 – зигота; 4 – импринтированный район.

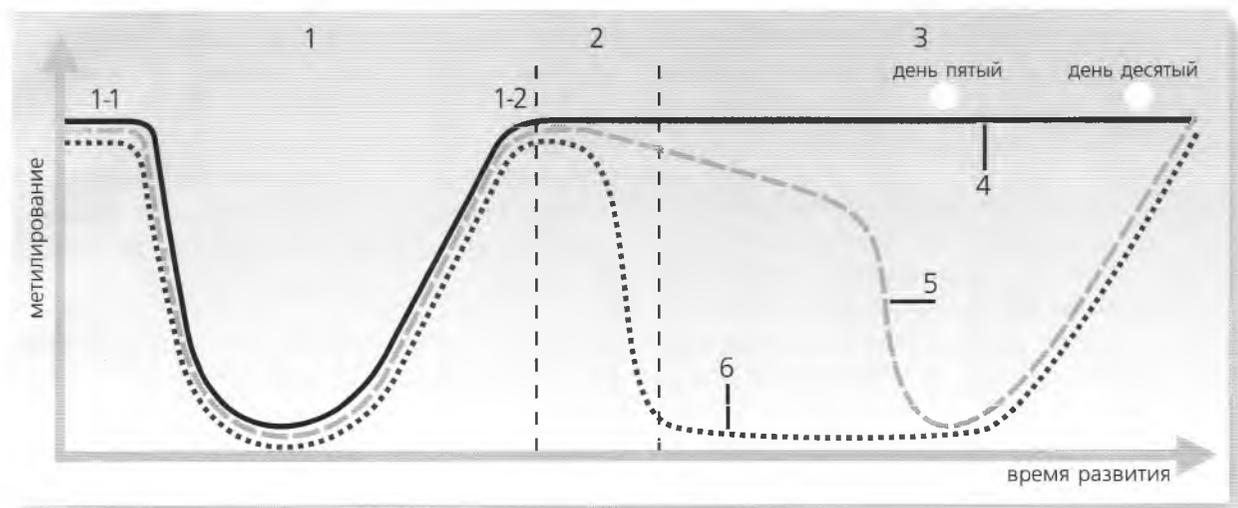


Рис. 1.46. Эпигенетическое репрограммирование во время созревания половых клеток, оплодотворения и раннего развития эмбриона (цит. по Reik and Walter, 2001):
 1 – половые клетки (1-1 – примордиальные, 1-2 – зрелые); 2 – оплодотворение;
 3 – эмбрион; 4 – импринтированные гены; 5 – неимпринтированные материнские гены;
 6 – неимпринтированные отцовские гены.

моноаллельная, а не биаллельная экспрессия гена. Второй аллель вследствие наличия некоего "отпечатка" импринтирован (выключен или подавлен) и не экспрессируется.

Механизмы действия геномного импринтинга до конца не изучены, одним из них является специфическое метилирование цитозиновых оснований ДНК. Метилирование ДНК осуществляется посредством ковалентной химической модификации азотистого основания – цитозина (С), в ходе которой происходит присоединение метильной группы к углероду, расположенному в положении 5' пиримидинового кольца. Метилирование ДНК приводит к выключению транскрипции гена, а деметилирование ДНК – к активации гена. В ДНК большая часть 5'-метилцитозина сосредоточена в динуклеотидах, в так называемых CpG-островках, которые чаще всего расположены в районах промоторов генов. По-видимому, метилирование ДНК препятствует взаимодействию регуляторных белков (факторов транскрипции) с промотором. Степень подавления активности гена пропорциональна плотности метилирования цитозина на услов-

ную единицу длины ДНК. В процессе метилирования принимают участие несколько ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, три гомолога DNMT3). Исследования на мышах и у человека показали, что импринтинг является консервативным механизмом регуляции экспрессии генов и играет важную роль в росте и развитии организма (Li et al., 1992; Okano et al., 1999; Lagger et al., 2002). С помощью метилирования ДНК происходят следующие процессы: индивидуальное развитие организма, супрессия функции определенных регуляторных элементов, защита генома от мобильных элементов, метилирование отдельных районов хромосом (перичентромерный гетерохроматин), что необходимо для поддержания целостности хромосом (Costello and Plass, 2001). В настоящее время у человека установлено более 50 генов, которые подвергаются геномному импринтингу (Thompson and Williams, 2005).

Как показали исследования, определенным этапам онтогенеза соответствуют разные состояния метилирования ДНК, наблюдаются так называемые волны метилирования в онтогенезе (Howlett and

Reik, 1991; Hajkova et al., 2002; Obata and Kono, 2002). Существуют по меньшей мере два критических периода, во время которых происходит эпигенетическое репрограммирование – во время гаметогенеза и на преимплантационной стадии развития эмбриона (рис. 1.46).

Первое эпигенетическое репрограммирование происходит в примордиальных половых клетках, обеспечивая генетическую тотипотентность. Зрелые сперматозоиды и ооциты имеют разную эпигенетическую организацию. В женских половых клетках ДНК менее метилирована, чем в мужских. Геном сперматозоида метилирован в большей степени, что обусловлено молекулярной организацией хроматина: ДНК в сперматозоиде образует комплекс не с гистонами, а с протаминами, что приводит к большей степени компактизации хроматина. После оплодотворения хромосомы мужской половой клетки деконденсируются, происходят замена протаминов на материнские гистоны и активное быстрое деметилирование. Процесс метилирования материнского генома протекает постепенно и более пассивно. Накануне формирования восьмиклеточного эмбриона происходит общее деметилирование ДНК, а во время имплантации ДНК вновь метилируется. Таким образом, активация генов зиготы и последующие этапы раннего развития эмбриона контролируются как генетическими, так и эпигенетическими регуляторными механизмами. Эпигенетическое репрограммирование необходимо для индивидуального развития организма, поскольку механизм включения–выключения генов позволяет контролировать экспрессию эмбриональных генов, деление клеток и детерминацию клеток эмбрионов на раннем этапе развития. Как показали многочисленные исследования на мышах, импринтированные гены задействованы в регуляции роста эмбриона и плода, в росте и функционировании плаценты. В процессе развития организма происходит изменение активности генов, т. е. одни гены до определенного времени неактивны (репрессированы), другие – активны на ранних этапах развития и инактивируются на более поздних этапах.

Такие эпигенетические процессы обуславливают клеточную дифференцировку в организме. Исследование закономерностей программированных волн метилирования/деметилирования, которые наблюдаются в процессе индивидуального развития, представляет как теоретическое, так и практическое значение (В.А. Гвоздев, 1999; С.А. Назаренко, 2002; De Rycke et al., 2002; Maher, 2005; Thompson and Williams, 2005).

Генетический импринтинг может проявляться не только на уровне гена и кластера генов, но и на уровне всей хромосомы или ее участка (однородительская дисомия), а также генома (наблюдается пузырный занос или развитие тератомы). Состояние развития организма с двумя гомологичными хромосомами от одного родителя называется однородительской дисомией (UPD), которая может иметь материнское или отцовское происхождение (рис. 1.47).

В зависимости от стадии мейотического деления, на которой происходит нерасхождение хромосом, возникает гетеродисомия (нерасхождение в первом мейотическом делении) и изодисомия (нерасхождение во втором мейотическом делении).

Дальнейшее исследование геномного импринтинга имеет существенное значение для понимания тонких механизмов регуляции генной активности в онтогенезе и установления связи этого явления с наследственными и онкологическими заболеваниями.

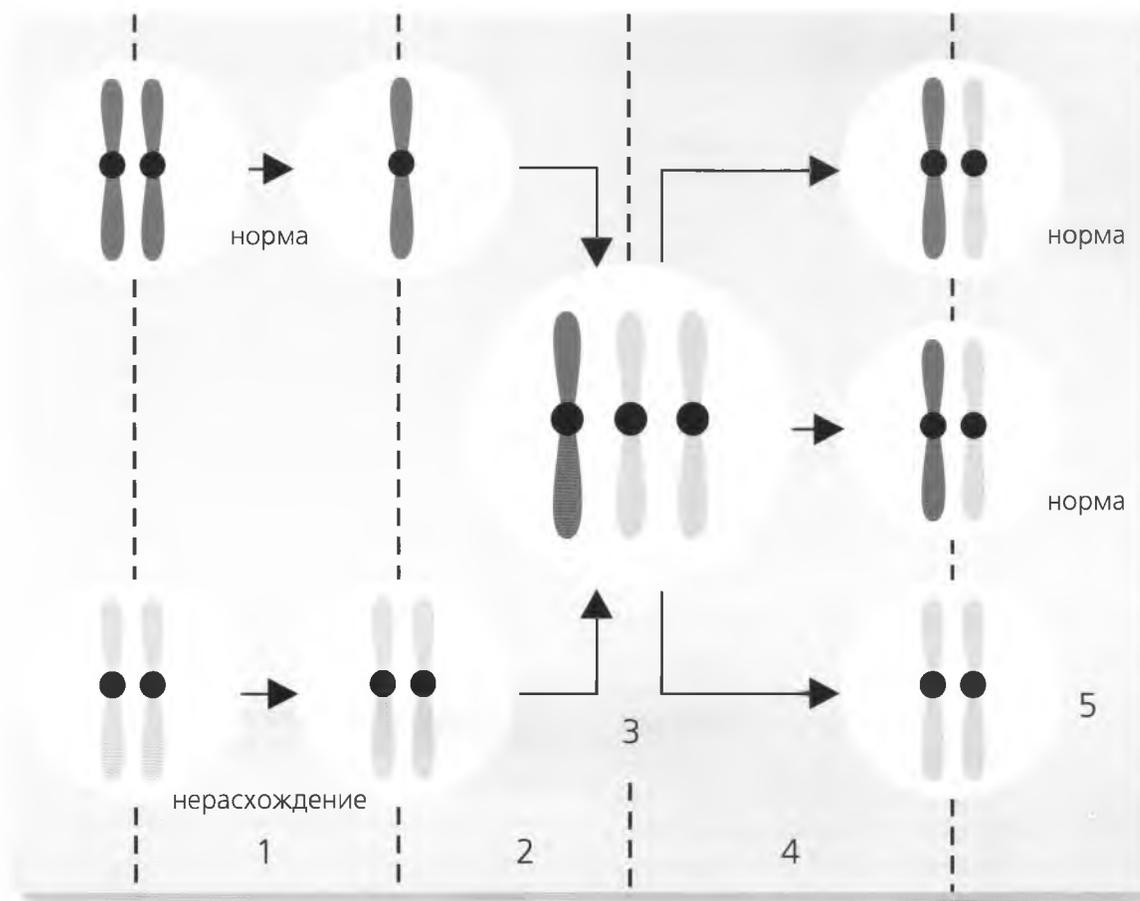


Рис. 1.47. Механизм возникновения однородительской дисомии. Схема:
 1 – мейоз; 2 – оплодотворение; 3 – зигота; 4 – возможные варианты потери одной хромосомы для восстановления диплоидного набора хромосом;
 5 – однородительская дисомия.

1.11. Идентификация генных мутаций

Мутации выявляют и идентифицируют молекулярными методами, анализируя структуру исследуемого участка ДНК. Современные методы позволяют использовать любые ДНК-содержащие клетки или ткани, а сам анализ может быть осуществлен, начиная с преимплантационной стадии развития организма. В основе молекулярного анализа лежит знание первичной структуры молекулы ДНК, а также исследование и определение количественных и качественных изменений в генах.

Первым методом идентификации мутаций был метод блот-гибридизации по Саузерну, предложенный в 1975 г. В настоящее время Саузерн-блоттинг применяется для идентификации протяженных мутаций, затрагивающих структуру гена (делеции, инсерции, дупликации). Другим базовым методом ДНК-диагностики является ПЦР, или специфическая амплификация ДНК, разработанная в 1983 г. К. Муллисом. ПЦР позволяет избирательно синтезировать в условиях *in vitro* относительно небольшие фрагменты ДНК, длиной от нескольких десятков до нескольких сотен п.н., реже до нескольких тысяч п.н. (рис. 1.48). Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности участков ДНК, фланкирующих участок амплификации. В настоящее время ПЦР является наиболее распространенным методом идентификации и анализа мутации.

Различают прямую и косвенную ДНК-диагностику моногенных заболеваний. Применение прямых методов возможно при наличии информации о нуклеотидной последовательности ДНК исследуемого гена, экзон-интронной организации и его клонировании. Эти методы предполагают непосредственное выявление мутации в исследуемом гене. Косвенные методы используют в следующих случаях: ген не клонирован, молекулярная организация гена не позволяет использовать прямые методы, заболевание явля-

ется генетически гетерогенным.

Косвенные методы предполагают использование сцепленных с геном полиморфных маркеров.

Прямые методы поиска мутаций основываются на использовании ПЦР и ее модификаций, а также метода секвенирования ДНК. С помощью этих методов возможно выявление точковых мутаций, небольших делеций, инсерций, мутаций, изменяющих длину амплифицированных фрагментов ДНК. Для идентификации мутаций, представляющих замену одного или нескольких нуклеотидов, разработаны методы, основанные на технологии ПЦР. При таком типе мутации длины амплифицированных фрагментов остаются постоянными, однако некоторые физико-химические свойства мутантных молекул ДНК меняются. Указанный метод используют для анализа динамических мутаций. Для идентификации разных мутаций в одном гене проводят одновременную амплификацию нескольких участков ДНК – мультиплексная полимеразная цепная реакция. Разработаны различные варианты поиска мутантных фрагментов ДНК и идентификации в них точковых мутаций на основе ПЦР: метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP), денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE), метод гетеродуплексного анализа (HA), метод химического расщепления некомплементарных сайтов (СМС), метод тестирования неполноценного белка (РТТ).

Выявленные этими методами мутации следует подтвердить результатами секвенирования изучаемого ДНК-фрагмента гена, так как только метод секвенирования дает полную информацию о типе и характере нуклеотидных изменений в последовательности ДНК. Секвенирование проводят согласно классическому методу Сэнгера.

Косвенные методы выявления мутаций

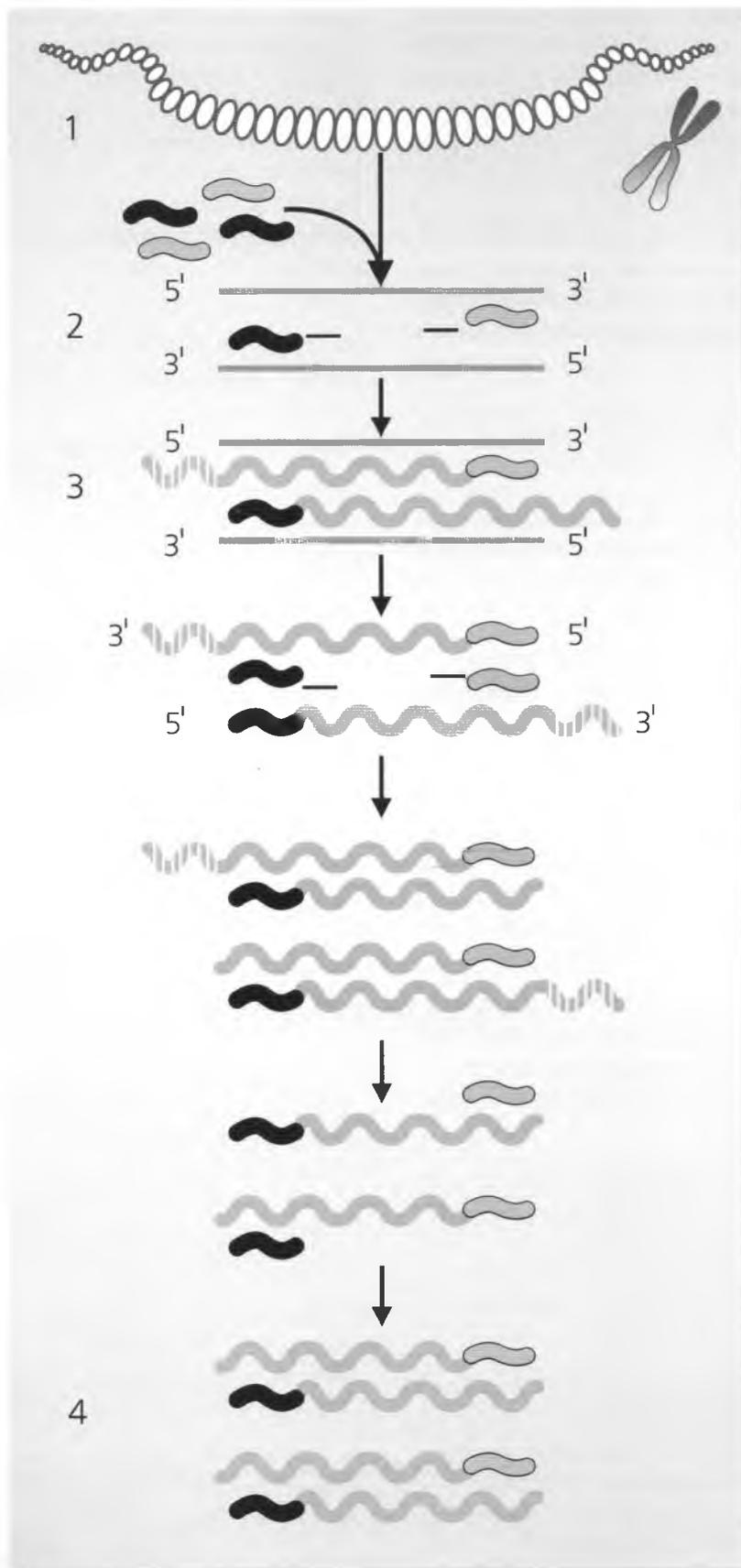


Рис. 1.48. Принцип ПЦР. Схема:
 1 – исходный фрагмент ДНК; 2 – денатурация ДНК и отжиг праймеров;
 3 – элонгация; 4 – две копии.

предполагают анализ сцепления генов, при этом производится анализ полиморфных генетических маркеров у больных и здоровых членов семьи. Расположенный вблизи изучаемого гена или внутри него полиморфный сайт служит маркером аллельных вариантов этого гена, в том числе маркером патологических мутаций. Технически данный анализ осуществляют так же, как и при прямой диагностике, но с математическим анализом сцепления признаков.

Таким образом, современные молекулярные и молекулярно-цитогенетические методы позволяют идентифицировать геномные, хромосомные и генные мутации и тем самым устанавливать генетический фактор, лежащий в основе патологического состояния, в том числе нарушения репродуктивной функции человека.

Литература

- Албертс Б., Брей Д., Льюис Д., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Д. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. – М.: Мир, 1994.
- Беникова Е.А., Бужиевская Т.И., Сильванская Е.М. Генетика эндокринных заболеваний. – Киев: Наук. думка, 1993. – 440 с.
- Богатирьова Р.В., Гречанина О.Я. Генетика репродуктивных втрат. – Київ: 2003. – 206 с.
- Бужієвська Т.І. Основи медичної генетики. – Київ: Здоров'я, 2001. – 134 с.
- Бужиевская Т.И., Выговская Т.В. Анеуплоидии у человека (факты и гипотезы) // Цитология и генетика. – 1990. – **24**. – С. 66–72.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Молекулярно-цитогенетическая пре- и постнатальная диагностика хромосомной патологии // Вестник РАМН. – 1999. – **11**. – С. 12–15.
- Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф. Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин: Обзор литературы // Пробл. репродукции. – 1998. – **2**. – С. 12–21.
- Ворсанова С.Г., Кравец В.С., Новикова И.М., Юров Ю.Б., Зерова Т.Э., Галаган В.А., Бужиевская Т.И. Нетипичные случаи синдрома трипло-Х у детей // Зб. наук. пр. співробітників КМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ, 1999а. – Вип. 8., Кн. 2. – С. 73–79.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура. – Ростов-на-Дону: Изд. РГМУ, 1999б. – 192 с.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская генетика: Учеб. п. – М.: Медпрактика, 2006. – 300 с.
- Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинко-биологические аспекты. – Москва: Медпрактика-М, 2008. – 299 с.
- Гвоздев В.А. Регуляция активности, обусловленная химической модификацией (метилованием) ДНК // Сорос. образоват. журн. – 1999. – № 10. – С. 11–17.
- Гершензон С.М. Основы современной генетики. – Киев: Наук. думка, 1983. – 558 с.
- Гершензон С.М. Мутации. – Киев: Наук. думка, 1991. – 112 с.
- Гершензон С.М. Многообразное значение мейоза для проблем общей биологии. – Киев: Наук. думка, 1996. – 138 с.
- Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: 2003. – 480с.
- Зерова-Любимова Т.Э., Кононенко М.И., Дарий А.С., Денисенко С.В. Современные технологии для идентификации маркерных хромосом: применение multiFISH // Материалы IV Рос. конгресса по современным технологиям в педиатрии и детской хирургии. – М., 2005. – С. 69–70.
- Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий // Сорос. образоват. журн. – 2000. – № 6. – С. 32–36.
- Курило Л.Ф., Шаронин В.О., Ворсанова С.Г. Уровень нерасхождения хромосом на разных стадиях развития мужских половых клеток человека // Пробл. репродукции. – 1998. – № 6. – С. 50–55.
- Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Тканеспецифичный плацентарный мозаицизм по аутосомным трисомиям у спонтанных абортусов человека: механизмы формирования и фенотипические эффекты // Генетика. – 2001. – **37**. – С. 1459–1474.
- Левитский Г.А. Материальные основы наследственности. – Киев: Государственное издательство Украины, 1924. – 168 с.

Медицина генетика: Підручник / Кол. авт.; За ред. О.Я.Гречаніної, Р.В.Богатирьової, О.П.Волосовця. – К.: Медицина, 2007. – 536 с.

Назаренко С.А. Эпигенетическая регуляция активности генов и ее эволюция // Эволюционная биология: Материалы II Междунар. конф. "Проблема вида и видообразование". – Томск: Томск. гос. ун-т, 2002. – 2. – С. 82–93.

Островерхова Н.В., Назаренко С.А., Черемных А.Д. Сравнительная геномная гибридизация как метод оценки геномного дисбаланса // Генетика. – 2002а. – 38. – С. 149–160.

Островерхова Н.В., Назаренко С.А., Лебедев И.Н., Черемных А.Д., Никитина Т.В., Суханова Н.Н. Детекция анеуплоидии у спонтанных абортусов методом сравнительной геномной гибридизации // Генетика. – 2002б. – 38. – С. 1435–1442.

Подугольникова О.А. Нерасхождение хромосом у человека. Гипотезы и факты // Генетика. – 1988. – 24. – С. 389–395.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2-х т. – М.: Мир., 1998.

Соловьев И.В., Ворсанова С.Г., Демидова И.А., Вехова Н.В., Шаронин В.О., Мале Р., Казанцева Л.З., Гречанина Е.Я., Бужиевская Т.И., Зерова Т.Э., Ройзес Ж., Юров Ю.Б. Роль молекулярно-цитогенетической диагностики в пост- и пренатальном выявлении хромосомной патологии // Ультразвуковая пренатальная диагностика. – 1995. – 6-7. – С. 65–70.

Чадов Б.Ф. От феномена нерасхождения к проблеме коордации хромосом // Генетика. – 1991. – 27. – С. 1877–1898.

Ченцов Ю.С. Современные представления о строении митотических хромосом // Сорос. образоват. журн. – 1996. – 8. – С. 14–22.

Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Монахов В.В., Берешева А.К., Соловьев И.В., Юров Ю.Б.

Молекулярно-цитогенетическое исследование робертсоновской транслокации 13;14 и синдрома Дауна у ребенка 3-х лет // Цитология и генетика. – 2004. – 38, 6. – С. 54–59.

Юров И.Ю., Соловьев И.В., Монахов В.В., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Количественный анализ сигналов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) для молекулярно-цитогенетической диагностики // Клини. лаб. диагностика. – 2005. – № 11. – С. 33–36.

Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г. Молекулярно-цитогенетические исследования хромосомных аномалий и нарушений при нервно-психических заболеваниях: поиск биологических маркеров для диагностики // Вестник РАМН. – 2001. – 7. – С. 26–31.

Юров Ю.Б. Оптимизация условий гибридизации клонированных последовательностей ДНК и дифференциального окрашивания хромосом человека // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1984. – 5. – С. 595–598.

Armstrong S.J., Goldman A.S.H., Speed R.M., Hulten M.A. Meiotic studies of a human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggests postzygotic selection rather than preferential 3:1 MI segregation as the cause of liveborn offspring with an unbalanced translocation // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – 67. – P. 601–609.

Barrett I.J., Lomax B.L., Loukianova T., Tang S.S., Lestou V.S., Kalousek D.K. Comparative genomic hybridization: a new tool for reproductive pathology // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2001. – 125. – P. 81–84.

Costello J.F., Plass C. Methylation matters // J. Med. Genet. – 2001. – 38. – P. 285–303.

Cremer T., Landegent J., Bruckner A., Scholl H.P.N., Schardin M., Hager H.-D., Devillee P., Pearson P., van der Ploeg M. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L 1.84 // Hum. Genet. – 1986. – 74. – P. 346–352.

- Crolla J.A., Youings S.A., Ennis S., Jacobs P.A.* Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2005. – **13**. – P. 154–160.
- De Rycke M., Liebaers I., Van Steirteghem A.* Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance // *Hum. Reprod.* – 2002. – **17**. – P. 2487–2494.
- De Vries B.B.A., White S.M., Knight S.J.L., Regan R., Homfray T., Young I.D., Super M., McKeown C., Splitt M., Quarrell O.W.J., Trainer A.H., Niermeijer M.F., Malcolm S., Flint J., Hurst J.A., Winter R.M.* Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist // *J. Med. Genet.* – 2001. – **38**. – P. 145–150.
- Dumollard R., Marangos P., Fitzharris G., Swann K., Duchon M., Carroll J.* Sperm-triggered $[Ca^{2+}]$ oscillations and Ca^{2+} homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production // *Development.* – 2004. – **131**. – P. 3057–3067.
- Egozcue S., Blanco J., Vidal F., Egozcue J.* Diploid sperm and the origin of triploidy // *Hum. Reprod.* – 2002. – **17**. – P. 5–7.
- Faraut T., Mermet M.-A., Demongeot J., Cohen O.* Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – **88**. – P. 15–21.
- Fryns J.P., Van den Berghe H.* Paracentric inversion in man: personal experience and review of the literature // *Hum. Genet.* – 1980. – **54**. – P. 413–416.
- Golubovsky M.D.* Postzygotic diploidization of triploids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning // *Hum. Reprod.* – 2003. – **18**. – P. 236–242.
- Gravholt C.H., Friedrich U., Caprani M., Jorgensen A.L.* Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence in situ hybridization // *Genomics.* – 1992. – **14**. – P. 924–930.
- Greulich K.M., Kreja L., Heinze B., Rhein A.P., Weier H.-U.G., Bruckner M., Fuchs P., Molls M.* Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH // *Mutat. Res.* – 2000. – **452**. – P. 73–81.
- Hajkova P., Erhardt S., Lane N., Haaf T., El-Maarri O., Reik W., Walter J., Surani M.A.* Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells // *Mech. Dev.* – 2002. – **117**. – P. 15–23.
- Hassold T., Hunt P.* To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – **2**. – P. 280–291.
- Hassold T., Sherman S., Hunt P.* Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – **9**. – P. 2409–2419.
- Hassold T., Judis L., Chan E.R., Schwartz S., Seftel A., Lynn A.* Cytological studies of meiotic recombination in human males // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – **107**. – P. 249–255.
- Hochstenbach R., Ploos van Amstel H.K., Poot M.* Microarray-based genome investigation: molecular karyotyping or segmental aneuploidy profiling? // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – **14**. – P. 262–265.
- Howlett S.K., Reik W.* Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development // *Development.* – 1991. – **113**. – P. 119–127.
- Hunt P.A., Hassold T.J.* Sex matters in meiosis // *Science.* – 2002. – **296**. – P. 2181–2183.
- Iitsuka Y., Bock A., Nguyen D.D., Samango-Sprouse C.A., Simpson J.L., Bischoff F.Z.* Evidence of skewed X-chromosome inactivation in 47,XXY and 48,XXYY Klinefelter patients // *Am. J. Med. Genet.* – 2001. – **98**. – P. 25–31.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B.*

Chromosomal variation in mammalian neuronal cells: known facts and attractive hypotheses // In: International Review of Cytology. – A Survey of Cell Biology. – **249**. – ed. – Jeon K.W. – Academic Press. – Berlin, Heidelberg, London, New York, Paris, Singapore, Sidney, Tokyo. – 2006. – P. 143–191.

ISCN 2005. An international system for human cytogenetic nomenclature / Eds L.G. Schaffer, N. Tommerup. – Basel: S. Karger, 2005. – **6**. – P. 128.

Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors // Science. – 1992. – **258**. – P. 818–821.

Lagger G., O'Carroll D., Rembold M., Khier H., Tischler J., Weitzer G., Schuettengruber B., Hauser C., Brunmeir R., Jenuwein T., Seiser C. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression // EMBO J. – 2002. – **21**. – P. 2672–2681.

Lefievre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., Hughes D.C., Barratt C.L.R. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human // Hum. Reprod. – 2004. – **19**. – P. 1580–1586.

Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality // Cell. – 1992. – **69**. – P. 915–926.

Liehr T., Claussen U., Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans // Cytogenet. Genome Res. – 2004. – **107**. – P. 55–67.

Liu L., Keefe D.L. Cytoplasm mediates both developmental and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes // Biol. Reprod. – 2000. – **62**. – P. 1828–1834.

Madan K., Menko F.H. Intrachromosomal insertions: a case report and a review // Hum.

Genet. – 1992. – **89**. – P. 1–9.

Maher E.R. Imprinting and assisted reproductive technology // Hum. Mol. Genet. – 2005. – **14**. – P. R133–R138.

Mahmood R., Brierley C.H., Faed M.J.W., Mills J.A., Delhanty J.D.A. Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception // Hum. Genet. – 2000. – **106**. – P. 620–626.

Martin R.H., Ko E., Rademaker A. Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes // Am. J. Med. Genet. – 1991. – **39**. – P. 321–331.

McKusick V.A. Mendelian inheritance in man: catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. – Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 1998.

McKusick V.A. The anatomy of the human genome: a neo-Vesalian basis for medicine in the 21st century // JAMA. – 2001. – **286**. – P. 2289–2295.

McKusick V.A. Mendelian inheritance in man and its online version, OMIM // Am. J. Hum. Genet. – 2007. – **80**. – P. 588–604.

Midro A.T., Stengel-Rutkowski S., Stene J. Experiences with risk estimates for carriers of chromosomal reciprocal translocations // Clin. Genet. – 1992. – **41**. – P. 113–122.

Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities // Mol. Cell. Endocrinol. – 2001. – **183**. – P. S55–S58.

Munne S., Escudero T., Sandalinas M., Sable D., Cohen J. Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations // Cytogenet. Cell Genet. – 2000. – **90**. – P. 303–308.

Obata Y., Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth // J. Biol. Chem. –

2002. – **277**. – P. 5285–5289.

Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development // *Cell*. – 1999. – **99**. – P. 247–257.

Pellestor F. Different distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex // *Hum. Reprod.* – 1991. – **6**. – P. 1252–1258.

Pellestor F., Imbert I., Andreo B. Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm // *Am. J. Med. Genet.* – 2002. – **107**. – P. 109–114.

Pettenati M.J., Rao P.N., Phelan M.C., Grass F., Fao K.W., Cosper P., Carroll A.J., Elder F., Smith J.L., Higgins M.D. et al. Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases // *Am. J. Med. Genet.* – 1995. – **55**. – P. 171–187.

Pieters M.H., Geraedts J.P., Meyer H., Dumoulin J.C., Evers J.L., Jongbloed R.J., Nederlof P.M., van der Flier S. Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1990. – **53**. – P. 15–19.

Pinkef D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986. – **83**. – P. 2934–2938.

Primakoff P., Myles D.G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction // *Science*. – 2002. – **296**. – P. 2183–2185.

Reik W., Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – **2**. – P. 21–32.

Reynier P., May-Panloup P., Chretien M.-F., Morgan C.J., Jean M., Savagner F., Barriere P., Malthiery Y. Mitochondrial DNA content effects the fertilizability of human oocytes // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. – **7**. – P. 425–429.

Richards R.I., Sutherland G.R. Dynamic muta-

tions: a new class of mutations causing human disease // *Cell*. – 1992. – **70**. – P. 709–712.

Ried T., Schrock E., Ning Y., Wienberg J. Chromosome painting: a useful art // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – **7**. – P. 1619–1626.

Rothlisberger B., Schinzel A., Kotzot D. A new molecular approach to investigate origin and formation of structural chromosome aberrations // *Chromosome Res.* – 2000. – **8**. – P. 451–453.

Saracoglu K., Brown J., Kearney L., Uhrig S., Azofeifa J., Fauth C., Speicher M.R., Eils R. New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization // *Cytometry*. – 2001. – **44**. – P. 7–15.

Savage A.R., Petersen M.B., Pettay D., Taft L., Allran K., Freeman S.B., Karadima G., Avramopoulos D., Torfs C., Mikkelsen M., Hassold T.J., Sherman S.L. Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – **7**. – P. 1221–1227.

Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. – Berlin: Walter de Gruyter, 2001. – 966 p.

Sierra S., Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss // *Semin. Reprod. Med.* – 2006. – **24**. – P. 17–24.

Soloviev I.V., Fayet F., Malet P., Yurov Y.B., Vorsanova S.G. Fluorescence in situ hybridization with a new approach for identification of trisomy 21 in interphases amniocytes using cosmid probes // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1995a. – **69**. – P. 119–120.

Soloviev I.V., Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Fayet F., Roizes G., Malet P. Prenatal diagnosis of trisomy 21 using interphase fluorescence in situ hybridization of postreplicated cells with site-specific cosmid contig probes // *Prenatal. Diagn.* – 1995b. – **15**. – P. 237–248.

Tachdjian G., Aboura A., Lapierre J.M.,

- Viquie F.* Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization // *Ann. Genet.* – 2000. – **43**. – P. 147–154.
- Therman E., Susman M.* Human Chromosomes. Structure, Behaviour, and Effects. – New York: Springer-Verlag, 1993. – 376 p.
- Thomas N.S., Ennis S., Sharp A.J., Durkie M., Hassold T.J., Collins A.R., Jacobs P.A.* Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – **10**. – P. 243–250.
- Thompson J.R., Williams C.J.* Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks // *Semin. Reprod. Med.* – 2005. – **23**. – P. 285–295.
- Van Blerkom J.* Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence // *Reproduction.* – 2004. – **128**. – P. 269–280.
- Van Blerkom J., Davis P., Alexander S.* Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence // *Hum. Reprod.* – 2000. – **15**. – P. 2621–2633.
- Van Blerkom J., Davis P., Mathwig V., Alexander S.* Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos // *Hum. Reprod.* – 2002. – **17**. – P. 393–406.
- Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Alexandrov I.A., Demidova I.A., Mitkevich S.P., Tirskaya A.F.* 18p-syndrome: an unusual case and diagnosis by in situ hybridization with chromosome 18-specific alphoid DNA sequence // *Hum. Genet.* – 1986. – **72**. – P. 185–187.
- Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Kurbatov M.B., Kazantzova L.Z.* Translocation t(1;17)(q12;q25) with clinical picture of proximal deletion 1q: molecular-cytogenetic detection by in situ hybridization with chromosome 1 specific DNA probe // *Hum. Genet.* – 1990. – **86**. – P. 173–174.
- Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Passarge I., Schmidt A., Zerova T.E., Demidova I.A., Buzhiyevskaya T.I.* Identification of marker chromosomes by in situ hybridization technique using alpha and "classical" satellite DNA probes with relative chromosomal specificity // *Tsitol. Genet.* – 1994. – **28**. – P. 67–70.
- Vorsanova S.G., Yurov Yu.B., Soloviev I.V., Demidova I.A., Malet P.* Rapid identification of marker chromosomes by in situ hybridization under different stringency conditions // *Anal. Cell. Pathol.* – 1994. – **7**. – P. 251–258.
- Vorsanova S.G., Yurov Yu.B., Kolotii A.D., Demidova I.A., Novikova I.M.* 16q subtelomeric deletion in proband with congenital malformations and mental retardation // *Цитология и генетика.* – 2000. – **34**, № 6. – С. 72–74.
- Vorsanova S.G., Kirillova E.A., Yurov Yu.B., Kolotii A.D., Monachov 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 // *BJMG.* – 2003a. – **6**. – P. 49–50.
- Vorsanova S.G., Yurov Yu.B., Beresheva A.K., Iourov I.Y., Monachov V.V., Sharonin V.O., Demidova I.A., Kravets V.S.* Alphoid DNA variations and non-disjunction in Down's syndrome: fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies // *BJMG.* – 2003b. – **3-4**. – P. 81–86.
- Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Iourov I.Y., Monakhov V.V., Kirillova E.A., Soloviev I.V., Yurov Y.B.* Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis // *J. Histochem. Cytochem.* – 2005. – **53**. – P. 375–380.

www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Wells D., Levy B. Cytogenetics in reproduc-

tive medicine: the contribution of comparative genomic hybridization (CGH) // *BioEssays*. – 2003. – **25**. – P. 289–300.

Wenger S.L., Steele M.W., Boone L.Y., Lenkey S.G., Cummins J.H., Chen X.Q. "Balanced" karyotypes in six abnormal offsprings of balanced reciprocal translocation normal carrier parents // *Am. J. Med. Genet.* – 1995. – **55**. – P. 47–52.

Youssoufian H., Pyeritz R.E. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans // *Nat. Rev. Genet.* – 2002. – **3**. – P. 748–758.

Zaragoza M.V., Jacobs P.A., James R.S., Rogan P., Sherman S., Hassold T. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns // *Hum. Genet.* – 1994. – **94**. – P. 411–417.

Zaragoza M.V., Surti U., Redline R.W., Millie E., Chakravarti A., Hassold T.J. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – **66**. – P. 1807–1820.

Zlotogora J. Germ line mosaicism // *Hum. Genet.* – 1998. – **102**. – P. 381–386.

Zwick M.E., Salstrom J.L., Langley C.H. Genetic variation in rates of nondisjunction: association of two naturally occurring polymorphisms in the chromokinesin nod with increased rates of nondisjunction in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1999. – **152**. – P. 1605–1614.

ГЛАВА II

Патофизиологические механизмы и генетические аспекты нарушения репродуктивной функции у мужчины

2.1. Нарушения репродуктивной функции у человека

Нарушения развития мочеполовой системы находятся на третьем месте по частоте встречаемости после пороков центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, при этом генетические факторы обуславливают около 30-40% этих нарушений. Несмотря на значительный прогресс в понимании репродуктивной физиологии человека, вклад генетически обусловленных факторов в нарушения репродуктивной функции в настоящее время тщательно исследуется.

Отсутствие беременности в течение одного года регулярной половой жизни без применения контрацепции позволяет говорить о бесплодном браке (WHO, 1999). Подобный временной интервал обусловлен тем, что в 25% случаев зачатие происходит в течение первого месяца, в 60% – в течение шести месяцев и в 80-85% – в течение двенадцати месяцев регулярных половых актов без применения контрацепции.

По оценкам ВОЗ около 15% супружеских пар (60-80 млн) в мире бесплодны; беременность наступает в естественных условиях, но заканчивается мертворождением в 10% случаях, у 10-25% супружеских пар наблюдают вторичное бесплодие. Несмотря на то, что число бесплодных супружес-

ких пар не увеличивается, все больше людей обращаются к врачам с целью лечения бесплодия.

Первичное бесплодие определяется неспособностью зачать в настоящем и прошлом времени и наблюдается у 30% всех супружеских пар с нарушением репродуктивной функции. Вторичное бесплодие (составляет 70%) отличается от первичного наличием в анамнезе беременности и/или родов (Irvine, 1998; Seshagiri, 2001).

Ежегодно приблизительно 15% супружеских пар (от 13 до 18% по данным разных источников) независимо от расы или этнической группы терпят неудачу при первой попытке зачать ребенка (Mueller and Daling, 1989; Seshagiri, 2001; Feng, 2003). Причиной отсутствия беременности в 25-30% случаев является мужской фактор, 30-35% случаев обусловлены заболеваниями, выявленными у женщины, в 20-30% случаев нарушения обнаруживают у обоих супругов (сочетанный фактор) и у 10-15% супружеских пар этиология бесплодия неизвестна (Forti and Krausz, 1998; Dohle et al., 2005) (рис. 2.1). С учетом процентов, которые приходятся на сочетанный фактор, уровень мужского бесплодия значительно выше.



Рис. 2.1. Соотношение этиологических факторов нарушения репродуктивной функции у человека (цит. по Dohle et al., 2005)

В зарубежной научной литературе состояние, сопровождающееся нарушением репродуктивной функции, определяется терминами "sterility", "subfertility" (или "relative infertility"), "idiopathic infertility" (или "unexplained infertility"), позволяющими четко охарактеризовать и выделить этиологический фактор бесплодия. Термин "infertility" применяется для супружеских пар, у которых беременность не наступает на протяжении одного года (около 12-15% семей с проблемами репродуктивной функции относятся к этой категории) (WHO, 1999). Обычно в течение пяти лет примерно половине таких семей удастся зачать ребенка. Термин "sterility" обозначает абсолютную неспособность супружеской пары к зачатию ребенка в связи с мужской или женской "стерильностью", что может быть обусловлено физиологическими причинами: отсутствием матки, яичников, отсутствием овуляции (ановуляцией), преждевременным истощением функции яичников у женщин, полным отсутствием сперматозоидов в эякуляте, отсутствием яичек у мужчин.

Ранее женщины с непроходимостью фаллопиевых труб или мужчины с обструкцией семявыносящего протока считались бесплодными. Однако с развитием вспомогательных репродуктивных технологий эти супружеские пары могут стать родителями в результате использования программы суррогатного материнства или применения донорских ооцитов, сперматозоидов, эмбрионов. Кроме того, использование инвазивных методов получения сперматозоидов и их незрелых форм (TESA, PESA, TESE, MESA) позволило отказаться от донации сперматозоидов. Термин "subfertility" ("relative infertility") означает сниженную способность к воспроизведению, но не ее отсутствие.

В русскоязычной научной литературе принято использовать следующие термины: "бесплодие", "первичное бесплодие" и "вторичное бесплодие", "идиопатическое бесплодие" (рис. 2.2). Бесплодие называют идиопатическим при неустановленной причине нарушения репродуктивной функции.

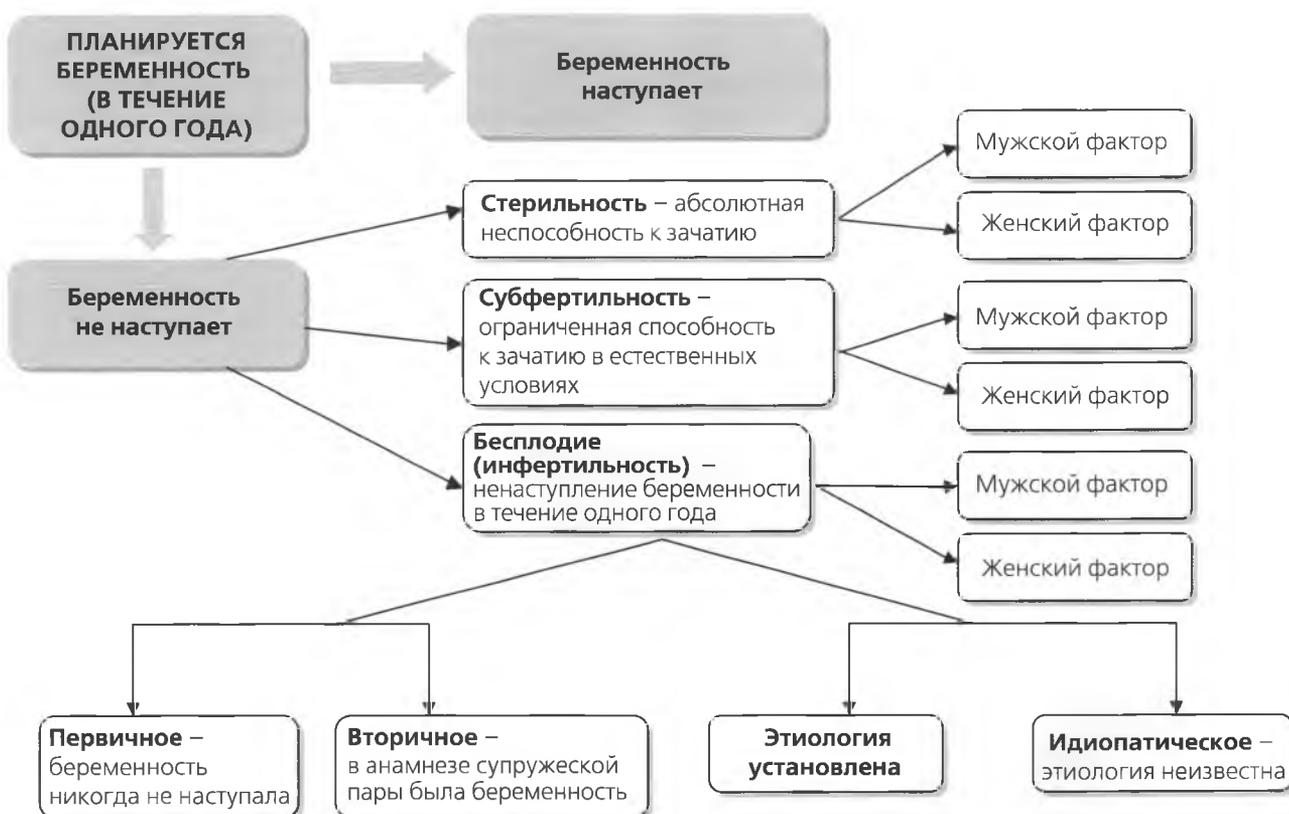


Рис. 2.2. Типы бесплодия, их терминология

**Таблица 2.1. Частота наступления беременности (%)
в естественных условиях у семейных пар
с идиопатическим бесплодием
(цит. по Baird et al., 2005)**

Длительность бесплодия	Возраст женщины, лет			
	<25	26–30	31–35	>35
1–2 года	52	41	29	30
2–3 года	33	28	12	18
3–4 года	28	26	7	<4
>5 лет	–	26	5,5	>2

В настоящее время в связи с применением ВРТ, позволяющих преодолеть бесплодие, широкое распространение получил термин "супружеские пары с нарушением репродуктивной функции".

Наиболее важными факторами, которые необходимо учитывать при прогнозировании наступления беременности, являются продолжительность бесплодия, возраст женщины, наличие или отсутствие беременности в прошлом (первичное или вторичное бесплодие), результаты спермограммы. С возрастом наблюдается снижение вероятности наступления беременности: способность к зачатию 35-летней женщины составляет лишь 50% потенциала к зачатию и вынашиванию 25-летней женщины; к 38 годам этот потенциал снижается до 25%, после 40 лет – до 5% (Dohle et al., 2005) (**табл. 2.1**). В связи с этим при диагностике мужского фактора бесплодия необходимо учитывать возраст и состояние фертильности женщины.

В **табл. 2.2** представлены наиболее распространенные причины нарушения репродуктивной функции, с которыми сталкивается супружеская пара после одного–двух лет осуществления попыток зачать.

Генетический фактор составляет как минимум 20% всех причин нарушения репродуктивной функции (примерно у 15% мужчин и 10% женщин) (Mak and Jarvi, 1996; Foresta et al., 2002; Wiland et al., 2002). Эти процентные показатели со временем подвергнутся коррекции в связи с развитием новых технологий. Некоторые генетичес-

кие факторы, такие как хромосомные аномалии, а также целый ряд генных мутаций, уже установлены, однако большинство из них все еще остаются нерасшифрованными. Большой вклад в определение причин нарушения репродуктивной функции у человека был сделан с развитием ВРТ. Знание генетических механизмов возникновения нарушения репродуктивной функции чрезвычайно важно в связи с использованием ВРТ, которые в определенной степени увеличивают риск возможной передачи генной патологии потомству, что обусловлено не самой технологией процедуры, а возможной передачей ребенку мутации или хромосомной перестройки от одного из родителей. Доступные на сегодня методы позволяют выяснить генетическую основу бесплодия и определить риск возможной передачи наследственной патологии для конкретной пары. Генетическая оценка нарушения репродуктивной функции включает тестирование супругов с целью выяснения причины бесплодия; цитогенетическое и молекулярное обследование во время применения одной из лечебных программ ВРТ; проведение преимплантационной и пренатальной диагностики для выявления моногенной и хромосомной патологии после применения ВРТ. При установлении генетической природы нарушения репродуктивной функции у одного из супругов необходимо проведение медико-генетического консультирования. Рассмотрим более детально генетические факторы, которые являются причиной бесплодия.

Таблица 2.2. Наиболее распространенные причины нарушения репродуктивной функции у супружеских пар (цит. по Forti and Krausz, 1998)

Проблемы репродукции	Мужчина	Женщина	Частота, %			
			Ж	М	Ж и М	всего
Стерильность	Азооспермия Аспермия Отсутствие яичек	Двусторонняя непроходимость фаллопиевых труб Аменорея с повышенным уровнем ФСГ Гипогонадотропный гипогонадизм Отсутствие матки	10	3	8	21
Субфертильность	Аномальные показатели спермограммы (олиго-/астено-/тератозооспермия)	Аномальное функционирование яичников Односторонняя непроходимость труб Эндометриоз Иммунологические факторы	20	20	25	65
Идиопатическое бесплодие	Нормальные показатели спермограммы Нормальная половая активность	Нормальная овуляция Нормальное функционирование фаллопиевых труб и матки	—	—	14	14

2.2. Этиологические факторы нарушения репродуктивной функции у мужчины

Термин "мужской фактор бесплодия" используется в случаях выявления нарушения репродуктивной функции у мужчины. Результаты первичного медицинского обследования и спермиологического анализа позволяют дать предварительную оценку причине нарушения репродуктивной функции у мужчины. Обычно мужское бесплодие классифицируют на основе результатов спермограммы. В большинстве случаев нарушение репродуктивной функции у мужчин связано с нарушениями выработки спермы, подвижности или функционирования сперматозоидов, а также нарушениями, связанными с транспортом сперматозоидов. Приблизительно у 30-40% мужчин с нарушениями выработки спермы не удается установить причину бесплодия (Maduro and Lamb, 2002). В табл. 2.3 представлены четыре основные причины мужского бесплодия, которые можно использовать как основу для понимания патофизиологических механизмов, вовлеченных в нарушение репродуктивной функции у мужчины.

Следует помнить, что в основе мужского бесплодия не всегда лежат нарушения, определяемые изменением параметров спермограммы. Азооспермия обуславливает бесплодие у мужчин в 0,9-16% случаев, тогда как общепопуляционная частота данного спермиологического нарушения составляет

примерно 2%. Азооспермией называют отсутствие сперматозоидов в образце эякулята. Различают обструктивную и необструктивную азооспермию (эксреторную и секреторную, соответственно), в основе каждой могут лежать генетические факторы. У пациентов с обструктивной азооспермией наблюдается нормальная вирилизация, что обусловлено адекватным функционированием яичек, тогда как у мужчин с необструктивной азооспермией возможен гипогонадизм, обусловленный снижением количества клеток Лейдига или нарушением их функционирования.

Обструктивная азооспермия возникает в результате врожденных или приобретенных повреждений семявыводящих путей при нормальной выработке сперматозоидов в яичке, однако транспорт спермы затруднен, что обуславливает отсутствие сперматозоидов в эякуляте. В основе обструктивной азооспермии могут лежать механические причины, воспалительные процессы, а также врожденная гипоплазия или аплазия семявыносящих протоков. В 29% случаев азооспермия обусловлена обструкцией семявыносящих путей (Л.В. Хилькевич и др., 1998). Около 60% случаев обструкции семявыносящих протоков вызваны мутацией гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*).

Таблица 2.3. Патофизиологические механизмы, лежащие в основе нарушения репродуктивной функции у мужчины

Причина нарушения репродуктивной функции	%	Характеристика
Азооспермия	0,9-16	Отсутствие в эякуляте сперматозоидов в связи с первичным/вторичным повреждением яичек либо обструкцией (непроходимостью) семявыносящих протоков
Нарушения репродуктивной функции, связанные с иммунологическими процессами	3,4-25	Агглютинация сперматозоидов
Аномальные показатели спермограммы (кроме азооспермии, которая выделена отдельно): аномальные показатели концентрации аномальные показатели морфологии аномальные показатели подвижности	23-48	Результат спермограммы свидетельствует о преобладании сперматозоидов с нарушениями функционирования, но присутствуют отдельные нормально функционирующие сперматозоиды
Нарушения функционирования сперматозоидов	0-25	Показатели спермограммы нормальные, но присутствуют скрытые нарушения сперматозоидов

Таблица 2.4. Нормальные показатели спермограммы (цит. по WHO, 1999)

Характеристика эякулята	Показатели
Объем, мл	2,0 и более
pH, единицы	7,2–7,8
Концентрация сперматозоидов, • 10 ⁶ /мл	20 и более
Общее количество сперматозоидов, • 10 ⁶ /эякулят	40 и более
Подвижность, %	50 и более
Поступательное движение при +37 °С	шкала 0–4
Морфология, % сперматозоидов с нормальным строением	не менее 30
Жизнеспособность, % живых сперматозоидов	50 и более
Лейкоциты, • 10 ⁶ /мл	менее 1,0

В основе необструктивной азооспермии лежит резкое снижение продуцирования сперматозоидов, что приводит к их отсутствию в эякуляте. Необструктивная азооспермия возникает в результате нарушения на разных этапах процесса сперматогенеза. Для пациентов с необструктивной азооспермией характерными признаками являются полная или частичная аплазия половых клеток (присутствуют только клетки Сертоли), наблюдается остановка созревания сперматозоидов на разных стадиях (гипосперматогенез). Необструктивную азооспермию выявляют у пациентов с синдромом Клайнфельтера, микроделецией хромосомы Y и другими генетически обусловленными заболеваниями (Foresta et al., 19986). В ряде случаев азооспермия является результатом гипогонадотропного гипогонадизма, при котором остановка созревания сперматозоидов обусловлена отсутствием адекватной гормональной стимуляции сперматогенеза.

Согласно анатомическому подходу выделяют три группы причин необструктивной азооспермии: претестикулярные, тестикулярные, пост-тестикулярные. В основе претестикулярных факторов необструктивной азооспермии лежат нарушения на уровне гипоталамуса и гипофиза. Для большинства пациентов с такими расстройствами характерны выраженные изменения соматичес-

кого здоровья. Тестикулярные причины включают нарушения сперматогенеза, в том числе спермиогенеза. При необструктивной азооспермии к тестикулярным причинам бесплодия относят хромосомные аномалии (численные и структурные изменения хромосом), а также микроделеции хромосомы Y, синдром "только клетки Сертоли". Среди мужчин с идиопатической необструктивной азооспермией микроделеции хромосомы Y встречаются с частотой до 20%, а хромосомные аномалии – около 15%, при этом преобладают численные аномалии гоносом (Foresta et al., 2002). К пост-тестикулярным причинам азооспермии относят нарушения эякуляции или обструкцию, которая препятствует попаданию сперматозоидов в семявыносящие пути.

Нарушения репродуктивной функции у мужчин, связанные с иммунологическими (аутоиммунными) процессами, являются причиной обращения супружеских пар за медицинской помощью в связи с бесплодием в 3,4–25% случаев (Baker, 2002). Основная причина иммунного фактора бесплодия заключается в нарушении целостности гематотестикулярного барьера, что может быть вызвано следующими факторами: травмой мошонки, хирургическими операциями на половых органах, обструкцией, эпидидимитом, инфекцией, в том числе передающейся половым путем, простатитом и другими

Таблица 2.5. Варианты аномалий эякулята (цит. по WHO, 1999)

Спермиологическое нарушение	Характеристика
Нормозооспермия	Параметры спермограммы находятся в пределах нормативных значений, которые указаны в таблице 2.4
Олигозооспермия	Концентрация сперматозоидов <20 млн/мл эякулята
Астенозооспермия	<50% сперматозоидов свойственно поступательное движение
Тератозооспермия	<30% сперматозоидов с нормальной морфологией
Олигоастенотератозооспермия	Показатели концентрации, подвижности и морфологии ниже границ, определенных ВОЗ
Азооспермия	Отсутствие сперматозоидов в эякуляте
Аспермия	Отсутствие эякулята

воспалительными процессами гениталий, идиопатическим иммунным фактором.

Аутоиммунная реакция бывает спонтанной, но чаще она вызвана травмой яичка, бактериальными и вирусными инфекциями (например, вирусным орхитом). Антиспермальные аутоантитела появляются у всех мужчин после вазэктомии. При аутоиммунной реакции против сперматогенного эпителия у мужчин образуются антиспермальные антитела, способные блокировать сперматогенез, нарушать подвижность сперматозоидов в эякуляте, препятствовать проникновению сперматозоидов в цервикальную слизь, а также нарушать капацитацию, акросомную реакцию, связывание сперматозоида с зоной пеллюцида ооцита, что затрудняет оплодотворение. Кроме того, АСАТ негативно влияют на процесс дробления эмбриона и могут вызывать прерывание беременности на ранних сроках. Диагноз изолированного иммунологического бесплодия ставят при наличии АСАТ и отсутствии другой патологии. АСАТ обнаруживают у 9-36% бесплодных пар, у супружеских пар, имеющих детей, этот показатель составляет 0,9-4%. Показания к проведению тестов на АСАТ включают наличие агрегации и агглютинации сперматозоидов, их низкую подвижность, феномен "движения на мес-

те" сперматозоидов, а также отклонения в посткоитальном тесте.

В настоящее время наиболее изучены несколько спермальных антигенов, связанных с нарушениями репродуктивной функции, а также выявлены и исследованы кодирующие их гены. Известны следующие АГ: YWK-II, BE-20, rSMP-B, BS-63, BS-17 и HED-2, которые различаются по структуре и синтезируются различными клетками репродуктивного тракта (сперматозоидами, клетками эпителия придатка яичка и клетками Сертоли) (Koide et al., 2000).

Аномальные показатели эякулята при проведении спермиологического анализа выявляют в 23-48% случаев мужского бесплодия и только у 5% фертильных мужчин. Спермиологический анализ проводят согласно рекомендациям ВОЗ, которые неоднократно дополнялись в 1980, 1987, 1992, 1999 гг. В 1999 г. Всемирной организацией здравоохранения были утверждены стандарты нормальных параметров эякулята (табл. 2.4).

Табл. 2.5 демонстрирует различные варианты спермиологических нарушений.

Сочетание олигозооспермии, астенозооспермии и тератозооспермии обозначается как олигоастенотератозооспермия. Од-

Таблица 2.6. Причины аномальных показателей спермиологического анализа

Причины	Факторы, лежащие в основе аномальных показателей спермы
Идиопатические	Различные
Врожденные	Крипторхизм
Приобретенные	Инфекция, использование анаболических стероидов
Генетические	Моногенные заболевания, хромосомные aberrации, в том числе микроделеции хромосомы Y
Ятрогенные	Радиотерапия, химиотерапия
Системные заболевания	Туберкулез, цирроз печени, уремия, сахарный диабет
Иммунологические	Травмы мошонки, обструкция, варикоцеле, инфекция, простатит
Профессиональные вредности	Гербициды, пестициды, повышенная температура в помещении и др.

ной из форм тератозооспермии является глобозооспермия, которая характеризуется наличием в эякуляте сперматозоидов с круглой, глобулообразной головкой и отсутствием акросомы. Указанное патологическое состояние получило название "синдром отсутствия акросомы в сперматозоидах". Некрозооспермия обозначает наличие в эякуляте нежизнеспособных или неподвижных сперматозоидов, при этом концентрация сперматозоидов сохраняется в пределах нормы. Причины отклонений от нормы параметров эякулята представлены в **табл. 2.6**.

Нарушения функционирования сперматозоидов подразумевают их скрытые аномалии, которые могут быть обусловлены ультраструктурными дефектами ядра, акросомы, центриолей, жгутика, а также дефектами процессов окисления и апоптоза.

В основе каждой из приведенных выше причин нарушения репродуктивной функции у мужчины может лежать генетический фактор. Продукты более чем 3000 генов участвуют в генетическом контроле процесса реализации репродуктивной функ-

ции у человека (Vogt, 2005). Большинство генов картированы на аутосомах и примерно 30 локализованы на хромосоме Y, мутации в них приводят к нарушению репродуктивной функции (Hargreave, 2000; Seshagiri, 2001). Помимо генных, известны также геномные и хромосомные мутации, которые также могут быть причиной бесплодия, первичного или вторичного. В связи с этим понятны трудности, возникающие при определении генетических причин мужского бесплодия.

М. Мацюк и Д. Лэм объединили нарушения репродуктивной функции у мужчины, в основе которых лежит генетический фактор, в четыре группы (Matzuk and Lamb, 2002) (**рис. 2.3**).

Хромосомная патология часто встречается у мужчин с нарушением репродуктивной функции. Второе место по частоте встречаемости у мужчин с бесплодием занимают микроделеции хромосомы Y. Выделен целый ряд моногенных заболеваний, сопровождающихся мужским бесплодием, большинство из них относят к группе нарушений гипоталамо-гипофи-

Хромосомные (численные/структурные) аномалии и микроделеции хромосомы Y

Аномалии гоносом:

- синдром Клайнфельтера, 47,XY⁺ и другие YY-анеуплоидии
- Смешанный гонадальный дисгенез (45,X/46,XY)
- Структурные аномалии хромосомы Y
- Транслокации между хромосомой Y и X/аутосомами
- Мужчина с кариотипом 46,XX

Аномалии аутосом:

- Реципрокные и Робертсоновские транслокации
- Частичные дупликации, делеции
- Инверсии
- Мозаицизм по трисомии хромосомы 21
- Дополнительные маркерные хромосомы

Микроделеции хромосомы Y

Нарушения детерминации пола/половой дифференцировки

Псевдогермафродитизм (NR5A1)

Реверсия пола

(SOX9, SRY, NROB1)

Синдром Дениса—Дрэша (WT1)

Псевдовагинальная промежностно-мошоночная гипоспадия (SRD5A, SRD5A2)

Крипторхизм

(HOXA10, INSL3, GREAT)

Врожденное двустороннее отсутствие семявыносящего протока (CFTR)

Синдром персистенции мюллеровых протоков

(AMH, AMHR)

Нарушения гипоталамо-гипофизарно-гонадной регуляции

Гипогонадотропный гипогонадизм (GNRH, KAL, PC1, GNRHR, LEP, PCSK1)

Дефекты гипофиза/гонадотропинов (LHB, HESX1, LHX3, PROP1)

Нарушение биосинтеза стероидных гормонов

(StAR, CYP21, TDD, CYP17)

Нарушение метаболизма стероидных гормонов

(SRD5, SRD5A)

Нарушение действия стероидных гормонов

(AR, ESR1)

Нарушения выработки и функционирования спермы

Миотоническая дистрофия (DMPK)

Синдром Нунан (PTPN11)

Серповидно-клеточная анемия (HBB)

β-талассемия (HBB)

Синдром Картагенера (DNAI1, DNAH5)

Первичная цилиарная дискинезия (DNAI1, DNAH5)

Анемия Фанкони (FANCA)

Атаксия—телеангиэктазия (ATM)

Рис. 2.3. Классификация патологических состояний, сопровождающихся бесплодием у мужчины, в основе которых лежит генетический фактор

Таблица 2.7. Клинические синдромы, сопровождающиеся бесплодием и плейотропным действием генов

Синдром	Ген	Локализация гена на хромосоме	MIM	
			Заболевание	Ген
α-талассемия, умственная отсталость (X-сцепленная)	<i>XH2</i>	Xq13	301040	300032
Барде—Бидля	<i>BBS2</i>	16q21	209900	606151
Муковисцидоз, врожденное двустороннее отсутствие семявыносящего протока	<i>CFTR</i>	7q31.2	219700 277180	602421 602421
Миотоническая дистрофия	<i>DMPK</i>	19q13.2 -q13.3	160900	605377
Ломкая хромосома X	<i>FMR1</i>	Xq27.3	309550	309550
Каллманна 1 (X-сцепленный), анозмия	<i>KAL1</i>	Xp22.3	308700	308700
Каллманна 2 (доминантный)	<i>FGFR1</i>	8p11-12	147950	136350
Каллманна 3 (рецессивный)	<i>PROKR2</i>	20p13	244200	607123
Картагенера	<i>DNAH5</i>	5p15-p14	244400	603335
	<i>DNAH11</i>	7p21	244400	603339
	<i>DNAI1</i>	9p21-p13	244400	604366
Кеннеди	<i>AR</i>	Xq11-12	313200	313700
Нунан	<i>PTPN11</i>	12q24.1	163950	176876
Прадера—Вилли	<i>SNRPN</i>	15q11-13	176270	182279
Штейна—Левенталья	<i>CYP11A</i>	15q23-24	184700	118485
Денис—Дрэша, опухоль Вильмса	<i>WT1</i>	11p13	194080	607102

зарно-гонадного тракта. Однако наиболее многочисленную группу патологических состояний составляют синдромы с плейотропным действием генов, которые принадлежат к группам нарушений детерминации пола/полового развития, нарушений гипоталамо-гипофизарно-гонадного тракта, а также выработки и функционирования сперматозоидов (табл. 2.7).

Выявление нарушения репродуктивной функции у мужчины и установление этиологического фактора осуществляют с помощью поэтапного комплексного обследования.

2.3. Оценка репродуктивной функции

Установление причины нарушения репродуктивной функции у мужчины основывается на комплексном обследовании с применением клинического и лабораторного исследований. Такой подход в большинстве случаев позволяет выявить и идентифицировать генетическую патологию, выбрать правильную тактику применения ВРТ.

Первый этап оценки репродуктивной функции включает клинико-генеалогическое, медицинское обследование и лабораторное исследование – спермиологический анализ.

Клинико-генеалогическое обследование позволяет собрать данные о длительности бесплодия, наличии в анамнезе спонтанного аборта(-ов), рождении ребенка (детей) с множественными пороками развития или мертворождении, наличии сибсов с бес-

плодием. При первичном обследовании учитывают информацию о заболеваниях, перенесенных в детстве, болезнях мочеполовой системы и хирургических вмешательствах, а также о наличии профессиональных вредностей и привычных интоксикаций.

Медицинское обследование включает первичный осмотр, оценку степени развития вторичных половых признаков: мужской тип костного скелета, развитие мускулатуры, распределение волосяного покрова, развитие молочных желез. В дополнение к общему медицинскому обследованию уделяют внимание осмотру гениталий: проводят осмотр полового члена с учетом расположения мочеиспускательного канала (его отверстия); пальпацию яичек, измерение их размера; оценивают наличие и состояние семявыносящего протока и придатков (рис. 2.4).

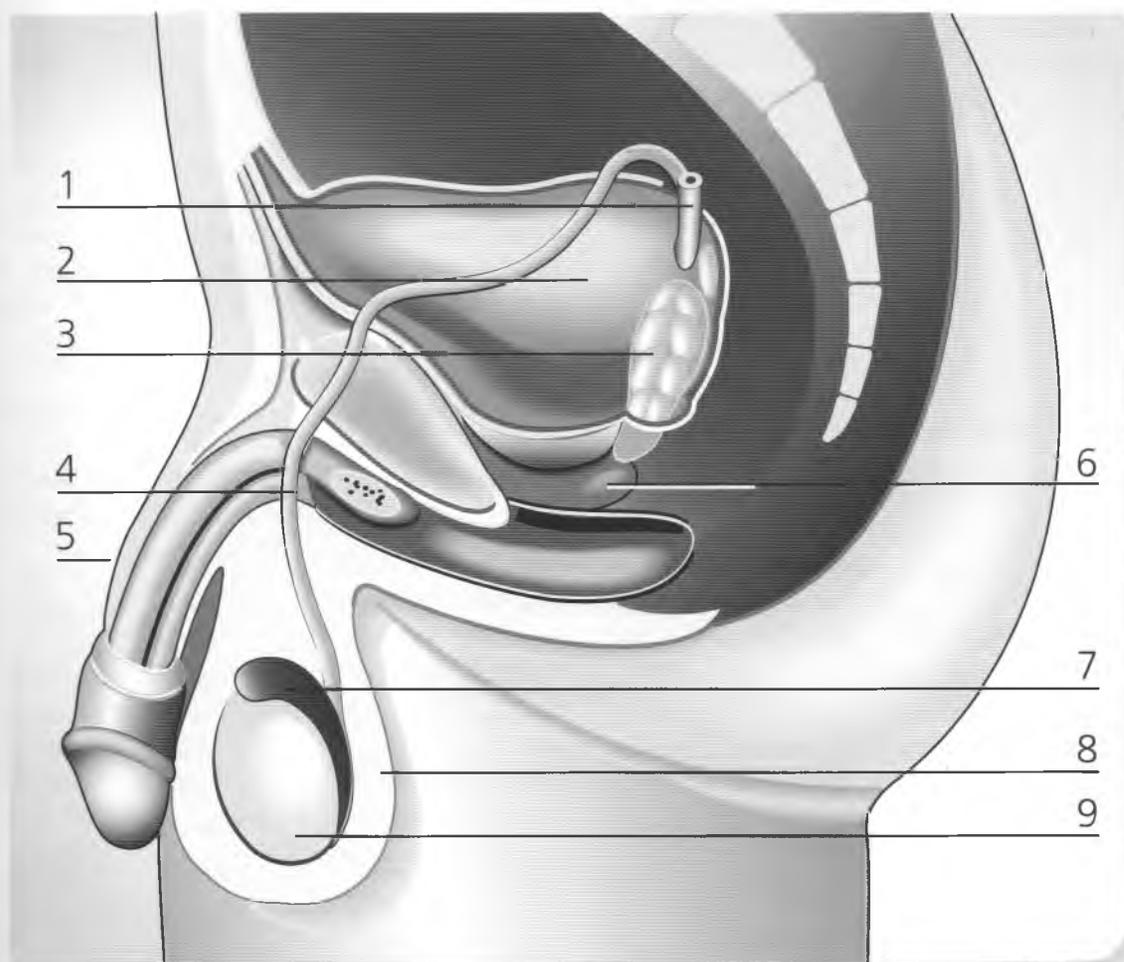


Рис. 2.4. Мужские половые органы: 1 – мочеточник; 2 – мочевой пузырь; 3 – семенные пузырьки; 4 – семявыводящий проток; 5 – половой член; 6 – предстательная железа; 7 – придаток яичка; 8 – мошонка; 9 – яичко.

Таблица 2.8. Физические и химические свойства эякулята

Анатомическая структура	Объем, мл	Характеристика жидкости
Уретральные и бульбоуретральные железы	0,1–0,2	Вязкая прозрачная
Яички, придатки, семявыносящий проток	0,1–0,2	Наличие сперматозоидов, карнитина
Предстательная железа	0,5–1,0	Кислая за счет содержания цитратов, жидкая
Семенные пузырьки	1,5–3,5	Щелочная, желеобразная, содержит фруктозу
Эякулят	0,5–1,0	pH 7,2–7,8, срок разжижения 20–25 мин, более 13 мМ фруктозы, наличие цитратов

Любое изменение консистенции и размеров ячеек в сторону снижения объема и более мягкой консистенции (что весьма субъективно) свидетельствует о гипогонадизме и/или тестикулярной дисфункции. Асимметрия размера ячеек может свидетельствовать о локальном поражении и тестикулярной дисфункции. Придатки ячеек в норме очень слабо дифференцируются от мягких тканей мошонки. При обследовании семенных канатиков оценивают наличие семявыносящего протока, который у 0,5% пациентов с бесплодием может отсутствовать с одной или двух сторон.

Среди лабораторных методов первостепенное значение имеет спермиологический анализ (спермограмма). Однако указанный тест позволяет получить 50% информации о состоянии фертильности, поскольку мужчина может быть бесплодным при нормальных показателях спермограммы, и, наоборот, причиной аномального результата спермограммы может быть вполне излечимое заболевание, а иногда и временное состояние или недомогание. Критерии оценки спермограммы должны соответствовать нормам ВОЗ. Анализ эякулята дает возможность оценить его физические и химические свойства, а также проанализировать количество, морфологию и подвижность сперматозоидов в эякуляте (табл. 2.8).

При нормальных показателях эякулята секрет семенных пузырьков составляет 80% его объема, который не зависит от проходности семявыносящих путей, кроме случаев дистальной обструкции на уровне семенных пузырьков или ниже. Как и объем, pH

эякулята напрямую зависит от работы семенных пузырьков. Это очень важный параметр, о котором часто забывают или неправильно трактуют. Снижение таких параметров, как объем эякулята, pH и концентрация сперматозоидов, является признаком обструкции одного из семенных пузырьков либо его агенезии. Снижение объема эякулята при сохранении pH (концентрация сперматозоидов при этом может быть как сохранена, так и нарушена) – признак ретроградной эякуляции (частичной), дискинезии эякуляторного тракта, реже – тестикулярной и претестикулярной дисфункции. Вязкость эякулята обеспечивает секрет семенных пузырьков, а срок разжижения в пробирке – ферменты, содержащиеся в предстательной железе. Отклонение времени разжижения от нормы может наблюдаться при простатите. Таким образом, pH и объем эякулята, независимо от других параметров, являются важными показателями фертильности, так как слабощелочная среда эякулята при достаточном объеме обеспечивает буферизацию (нейтрализацию) кислого содержимого влагалища.

Помимо данных о физическом и химическом составе эякулята, его лабораторное исследование позволяет охарактеризовать морфологические особенности сперматозоидов. Варианты аномалий головки, средней части и жгутика сперматозоида представлены на рис. 2.5.

Следует помнить, что, помимо сперматозоидов, в эякуляте могут содержаться клеточные элементы: предшественники сперматозоидов (сперматиды, находящиеся на разных этапах развития), клетки крови (лейкоциты, лимфоциты, эритроциты), иммунные клетки (лейкоциты, лимфоциты, спермио-

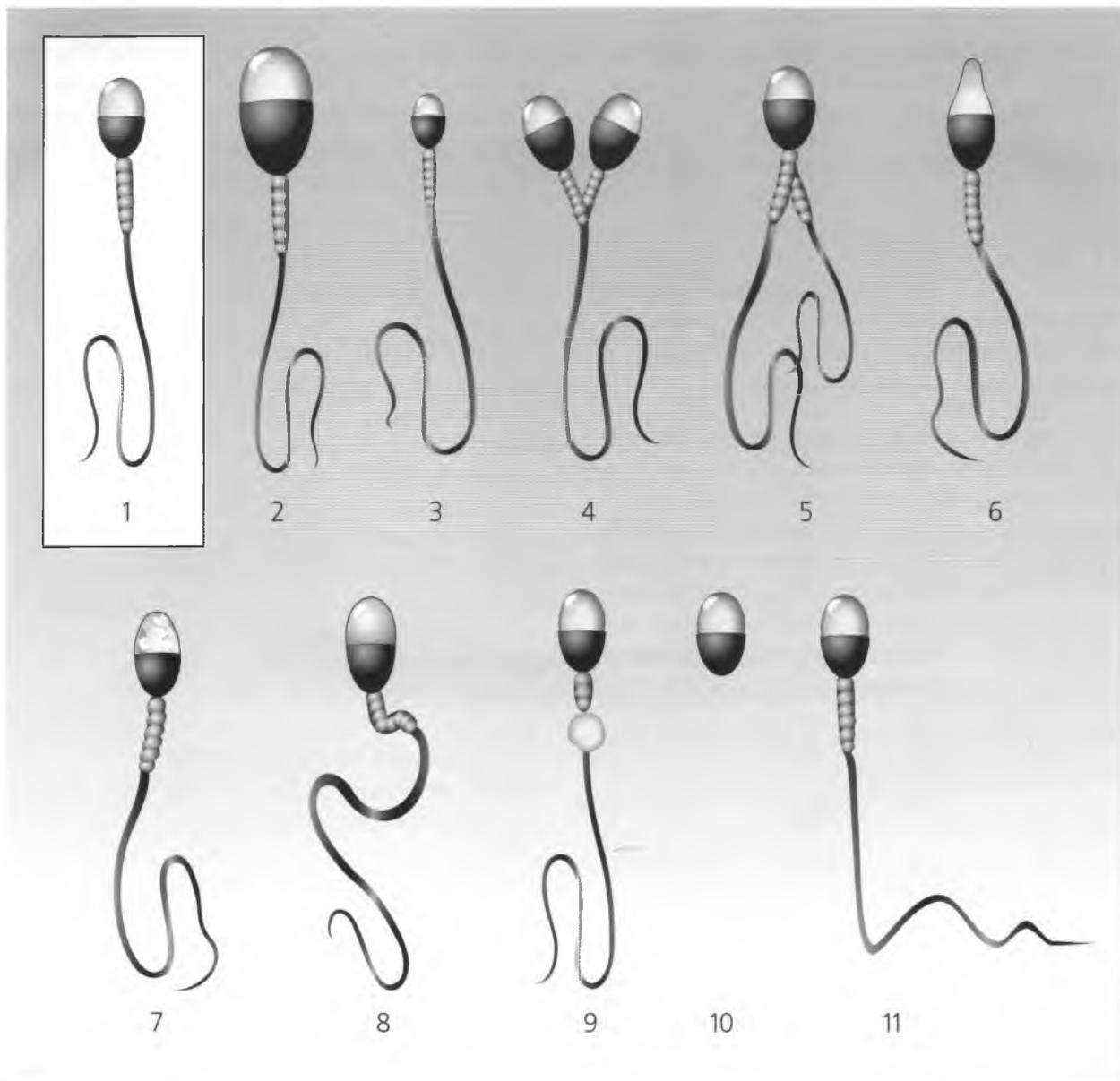


Рис. 2.5. Схематическое изображение вариантов аномалий головки, средней части и жгутика сперматозоида:

- 1 – сперматозоид с нормальной морфологией;
- 2 – увеличение размера головки; 3 – уменьшение размера головки;
- 4 – удвоение головки сперматозоида; 5 – удвоение жгутика;
- 6 – конусовидная форма головки; 7 – вакуолированная головка сперматозоида;
- 8 – согнутая шейка; 9 – наличие цитоплазматической капли;
- 10 – отсутствие средней части и жгутика; 11 – аномальный жгутик.

фаги, макрофаги, бактериофаги), бактерии. Выявление предшественников сперматозоидов при спермиологическом анализе – важный диагностический критерий нарушения спермиогенеза, а также один из ключевых диагностических критериев при азооспермии. При проведении спермограммы рекомендуют использовать "Лабораторное руководство к анализу спермы человека и исследованию взаимодействия спермы с

шейкой матки" (WHO, 1999).

Детальное исследование эякулята дает возможность оценить сперматогенез у обследуемого пациента, а также диагностировать проходимость половых путей. Клинические исследования пациентов с бесплодием позволили установить "границы нормы", ниже которых шансы на наступление беременности снижены. Эти границы

не абсолютны. И наоборот, у мужчин с нарушением репродуктивной функции показатели спермограммы могут быть в пределах нормы.

Алгоритм обследования мужчины с нарушением репродуктивной функции может включать проведение дополнительных клинических и лабораторных обследований: УЗИ мошонки, дополнительной спермограммы, иммунологического, гормонального, генетического (цитогенетический и молекулярный) анализов.

Ультразвуковое обследование позволяет определить размеры яичек, выявить структурные изменения и патологические образования в них, а также в придатках яичек и предстательной железе, изменения в семенных пузырьках при обструкции дистальных отделов семявыносящих путей или даже при их отсутствии, в случае врожденной агенезии семявыносящего протока.

Иммунологический анализ (MAR-тест, или анализ на антиспермальные антитела) регистрирует соотношение количества активно-подвижных сперматозоидов, покрытых АСАТ, к их общему количеству и является дополнительным к спермограмме анализом при нормальной концентрации и подвижности мужских половых клеток. Критерием положительного MAR-теста является превышение 50-процентного уровня. При нарушении подвижности сперматозоидов и/или выраженной патоспермии вместо MAR-теста проводят исследование антиспермальных антител в эякуляте и/или крови пациента – иммуноферментный анализ. Указанный анализ проводят также при азооспермии неясного генеза, что особенно важно для определения обструктивной и необструктивной азооспермии.

Гормональное обследование позволяет провести оценку эндокринного профиля мужчины и используется при выраженной патологической картине спермограммы и азооспермии (Е.А. Беникова и др., 1993). Минимальная исходная эндокринная оценка включает измерение уровня тестостерона, ФСГ, ЛГ и пролактина в сыворотке крови. Такую оценку необходимо проводить, если у пациента нарушена сексуальная функция; отмечаются другие клинические проявле-

ния, связанные с определенной эндокринопатией. Показания к проведению гормонального обследования включают выраженную патоспермию, азооспермию. Уровень пролактина определяют при подозрении на опухоль гипофиза.

Результаты гормонального обследования позволяют в отдельных случаях определить этиологический фактор бесплодия, например:

- уровень ФСГ выше нормы, уровень ЛГ выше нормы, уровень тестостерона ниже нормы – гипергонадотропный гипогонадизм (тестикулярный, первичный);
- уровень ФСГ ниже нормы, уровень ЛГ ниже нормы, уровень тестостерона ниже нормы – гипогонадотропный гипогонадизм (у пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом, помимо измерения концентрации ЛГ и ФСГ, необходимо проводить определение уровня и других гормонов гипофиза – АКТГ, ТТГ);
- уровень ФСГ выше нормы, уровень ЛГ и тестостерона в пределах нормы – изолированное нарушение сперматогенеза, наиболее часто встречаемое нарушение гормонального профиля у пациентов с бесплодием;
- уровень ФСГ в пределах нормы, уровень ЛГ выше нормы, уровень тестостерона ниже нормы – синдром частичной резистентности рецепторов к тестостерону.

Дополнительное гормональное обследование, в том числе определение уровня женских половых гормонов (эстрадиола), целесообразно при гинекомастии, ожирении, предполагаемой резистентности к андрогенам.

Результаты сопоставления показателей спермограммы с данными биохимического или иммунологического анализов служат маркером того или иного нарушения репродуктивной функции у мужчины, обеспечивая диагностику мужского бесплодия. В большинстве случаев проведение клинического и лабораторного обследований позволяет определить этиологию мужского бесплодия и назначить необходимое лечение в соответствии с особенностями конкретного случая. Список лабораторных анализов, которые проводят для установления причины нарушения репродуктивной функции у мужчины, представлен на **рис. 2.6**.

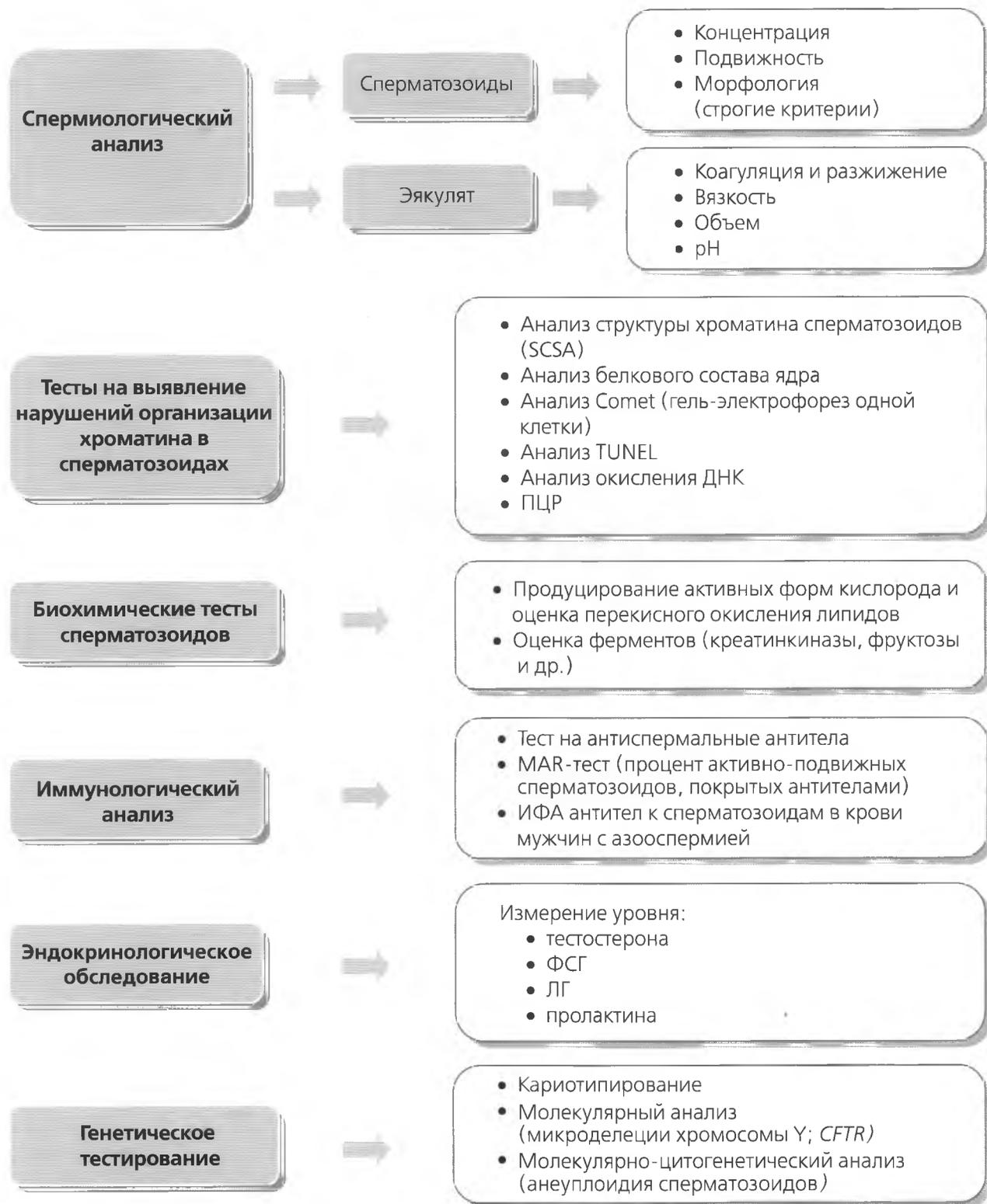


Рис. 2.6. Список лабораторных анализов, используемых для установления причины нарушения репродуктивной функции у мужчины

Таблица 2.9. Алгоритм проведения генетического тестирования согласно результатам спермиологического анализа (цит. по Foresta et al., 2002)

Генетическое тестирование	Результаты спермиологического анализа		
	Азооспермия	Олигозооспермия тяжелой степени (количество сперматозоидов $<10 \cdot 10^6$ /мл)	Олигозооспермия умеренной степени (количество сперматозоидов $10-20 \cdot 10^6$ /мл)
Цитогенетический анализ	В ходе диагностики. В начале программы ВРТ	В ходе диагностики. В начале программы ВРТ	Бесплодие в течение одного года половой жизни без контрацепции. В начале программы ВРТ
Молекулярный анализ (поиск микроделеций длинного плеча хромосомы Y)	В ходе диагностики (при отсутствии обструкции). В начале программы ВРТ по показаниям	В ходе диагностики. В начале программы ВРТ по показаниям	–
Молекулярный анализ (CFTR)*	В ходе диагностики (при наличии врожденного двустороннего отсутствия семявыносящего протока). В начале программы ВРТ по показаниям	В ходе диагностики (при наличии врожденного одностороннего отсутствия семявыносящего протока). В начале программы ВРТ по показаниям	–
Молекулярный анализ (KAL1)**	В ходе диагностики (при наличии гипогонадотропного гипогонадизма)	–	–
Молекулярный анализ (AR)***	В ходе диагностики (при наличии высокого индекса чувствительности к андрогенам)	В ходе диагностики (высокий индекс чувствительности к андрогенам)	–
Молекулярный анализ (SRD5A2)****	Выборочные клинические случаи	В отдельных клинических случаях	–

* **CFTR** – cystic fibrosis transmembrane receptor.

** **KAL1** – Kallmann 1.

*** **AR** – androgen receptor.

**** **SRD5A2** – steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2.

Дополнительное лабораторное обследование включает генетическое тестирование, к которому относятся цитогенетический и молекулярный анализы. Генетическое тестирование предполагает не только проведение указанных анализов, но и обязательное клинико-генеалогическое обследование супружеской пары, установление диагноза и типа наследования в случае наследственной патологии. Наличие нарушений репродуктивной функции у членов семьи может свидетельствовать о присутствии в родословной генетически обусловленного фактора бесплодия. В большинстве случаев цитогенетическое обследование проводится при аномальных результатах спермограммы (необструктивная азооспермия, патоспермия). Цитогенетический анализ позволяет выявлять численные и структурные аномалии гоносом и аутосом в кариотипе человека. В Клинике проблем планирования семьи (Киев, Украина) проведение цитогенетического анализа обоим супругам в начале программы ВРТ обязательно.

Молекулярный анализ позволяет выявлять микроделеции хромосомы Y (делеции субрегионов AZFa, AZFb, AZFc хромосомы Y). Около 10% случаев необструктивной азооспермии и патоспермии обусловлены именно микроделацией локуса AZF хромосомы Y (Kostiner et al., 1998; Silber, 1998; Kleiman et al., 1999; McLachlan and de Kretser, 2001; Foresta et al., 2002). Это исследование представляет не только диагностическую ценность, но и имеет большое значение при медико-генетическом консультировании, так как позволяет определять риск передачи выявленной делеции потомству мужского пола.

При наличии у мужчины врожденного двустороннего отсутствия семявыносящего протока проводят скрининг мутации в гене *CFTR* у обоих партнеров, при этом следует учитывать, что спектр мутаций в гене *CFTR* в разных популяциях варьирует (Lewis-Jones et al., 2000). Таким семьям рекомендуют проведение ДНК-тестирования эмбриона и плода после применения ЭКО с ICSI (преимплантационная и пренатальная диагностика). Мужчины с обструктивной азооспермией в результа-

те врожденного двустороннего отсутствия семявыносящего протока в 64% случаев находятся в группе риска носительства по крайней мере одной мутации в гене *CFTR* (Black et al., 2000).

В целом около 24% мужчин с аномальными показателями спермограммы имеют генетически обусловленную патологию. Наиболее распространенными являются хромосомные аномалии, микроделеции длинного плеча хромосомы Y и мутация в гене *CFTR* (Aittomaki et al., 2004). Генетические аномалии чаще всего обнаруживают у мужчин с неясной причиной олигозооспермии или тяжелой формой олигозооспермии, а также с необструктивной азооспермией. Мужчинам с тяжелой олигозооспермией и необструктивной азооспермией рекомендовано медико-генетическое консультирование.

В большинстве случаев хромосомная патология и микроделеции локуса AZF хромосомы Y возникают *de novo* в половых клетках мужчины, однако некоторые хромосомные и генные аномалии, к которым относятся реципрокные и Робертсоновские транслокации, мутации в гене *CFTR*, могут наследоваться в семье (Mak and Jarvi, 1996; Krausz et al., 1999a,b; Dohle et al., 2002; Sharlip et al., 2002; Quilter et al., 2003).

Согласно результатам различных клиник примерно у 20% мужчин нарушение репродуктивной функции обусловлено генетическим фактором (Wiland et al., 2002).

В **табл. 2.9** представлен алгоритм проведения генетического тестирования в зависимости от результатов спермиологического анализа.

Установление генетически обусловленной причины нарушения репродуктивной функции у мужчины позволяет идентифицировать причину бесплодия, выбрать правильную тактику лечения в каждом индивидуальном случае, рассчитать риск передачи патологии потомству.

Возможные варианты диагноза при сочетании определенных признаков с результатами генетического и цитогенетического анализов представлены в **табл.**

Таблица 2.10. Варианты возможных генетических причин нарушения репродуктивной функции у мужчины на основании результатов генетического и цитогенетического анализов (цит. по Kent-First, 2000)

Причины нарушения репродуктивной функции	Этиологический фактор															
	Хромосомный фактор	Генный фактор													Идиопатический фактор	
		Муковисцидоз	Делеция Y/AZFa	Делеция Y/AZFb	Делеция Y/AZFc	AR	мтДНК	Синдром Картагенера	fra-X	Синдром Каллмана	Серповидно-клеточная анемия	DAZ1	LHCGR	FSHR		DAX1
Азооспермия/ олигозооспермия	+	+	+	+	+	+		+				?				+
Олигозооспермия	+						+	+		+			+	?		+
Аномальная морфология сперматозоидов	+									+						+
Аномальная подвижность сперматозоидов							+	+								+
Обструктивная азооспермия, обусловленная врожденным двусторонним отсутствием семявыносящего протока		+														+
Эндокринопатия	+		+	+	+	+	+	+	+		+	?	+			+
Иммунологический фактор																+
Нарушение эякуляции																+
Крипторхизм	+		+	+	+	+			+			?				+

Причины нарушения репродуктивной функции					
	Хромосомный фактор				
		Муковисцидоз	Делеция Y/AZFa	Делеция Y/AZFb	Делеция Y/AZFc
Инфекция добавочных желез					
Гинекомастия	+				
Гипоспадия	+				
Нарушение функционирования надпочечников	+				
Аносмия, бесплодие					
Гипогонадотропный гипогонадизм	+				+
Патологии почек	+				
Непроходимость семенных канальцев					
Гонадальный дисгенез	+				
Половая железа с компонентами яичка и яичника/неопущение яичек	+				
Лимфедема	+				
Аномальные производные мюллеровых протоков	+				+
Гиперандрогения	+				

2.4. Хромосомные мутации (численные и структурные аномалии хромосом) у мужчин с нарушением репродуктивной функции

Ведущая роль в возникновении и формировании нарушений на генном или хромосомном уровнях организации наследственного материала принадлежит хромосомным аномалиям (De Braekeleer and Dao, 1991; Chandley, 1998; Foresta et al., 2002; Brugh et al., 2003; Duzcan et al., 2003; Vogt, 2004). В настоящее время хромосомные аномалии – наиболее изученный генетический фактор бесплодия у человека. Многолетний опыт медико-генетического консультирования супружеских пар с нарушением репродуктивной функции показал, что примерно каждая восьмая пара нуждается в проведении цитогенетического анализа (С.Г. Ворсанова и др., 1995, 1998а,б, 2006; П. Калантари и др., 2003; Yurov et al., 1996; Mau-Holzmann, 2005). Цитогенетический анализ дает возможность выявлять различного типа хромосомные аномалии, а современные вспомогательные репродуктивные технологии позволяют супружеским парам с наличием хромосомных аномалий иметь здорового ребенка. Впервые предположение о связи хромосомных aberrаций с бесплодием у мужчин было высказано в 1957 г. М. Фергюсоном-Смитом и соавт. Ученые при обследовании 91 мужчины с азооспермией и олигозооспермией выявили у 10 из них половой хроматин (Ferguson-Smith et al., 1957). Спустя два года П. Джейкобс и Д. Стронг обследовали 42-летнего мужчину с признаками синдрома Клайнфельтера (гинекомастия, гипоплазия яичек, гиалиноз тестикулярной ткани) и выявили у него дополнительную субметацентрическую хромосому (кариотип 47,XXY) (Jacobs and Strong, 1959).

Цитогенетическое обследование мужчин с нарушением репродуктивной функции в середине 70-х гг. прошлого столетия позволило подтвердить связь между хромосомными аномалиями и мужским бесплодием (Kjessler and Lundberg, 1974; Chandley, 1979; Huynh et al., 2002). Одновременно ученые установили, что у бесплодных мужчин синдром Клайнфельтера в 30 раз, а структурные аномалии хромосом в 10 раз встречаются чаще, чем у новорожденных (Zuffardi and Tiepolo, 1982).

Частота хромосомных аномалий существенно повышена в группе мужчин с бесплодием (от 2,1 до 8,6%) и составляет в среднем 5%, что значительно превышает этот показатель в группах здоровых взрослых мужчин (0,7-1%) и новорожденных (0,4%) (Chandley, 1979; Van Assche et al., 1996; Tuerlings et al., 1998; Bhasin et al., 2000; Foresta et al., 2002; Clementini et al., 2005) (табл. 2.11). Из этих 5% большую часть составляют аномалии половых хромосом (4%), на долю структурных перестроек приходится 1% (Bhasin et al., 2000).

Хромосомные аномалии чаще выявляют у мужчин с азооспермией – в 13,7-15% случаев (большую часть составляет синдром Клайнфельтера) (П. Калантари и др., 2003; Van Assche et al., 1996; Kim et al., 1999а; Foresta et al., 2002; Clementini et al., 2005). Аномалии половых хромосом преобладают у мужчин с азооспермией, аномалии аутосом – у пациентов с олигозооспермией (Foresta et al., 2002). У мужчин с аномальными показателями спермограммы отмечена обратная связь между количеством сперматозоидов в эякуляте и наличи-

Таблица 2.11. Сравнение показателей частоты хромосомных аномалий (%) у мужчин с патологическими показателями спермограммы и у новорожденных (цит. по Gardner and Sutherland, 2004)

Хромосомные аномалии	Бесплодные мужчины (n=7876)	Олигозооспермия (n=1701)	Азооспермия (n=1151)	Новорожденные (n=94465)
Аутосом	1,3	3	1,1	0,25
Половых хромосом	3,8	1,6	12,6	0,14
Всего	5,1	4,6	13,7	0,39

Таблица 2.12. Результаты цитогенетических исследований бесплодных мужчин с аномальными показателями концентрации сперматозоидов (цит. по Bourrouillou et al., 1997)

Показатель	Азооспермия	Олигозооспермия			Общее количество
		$<5 \cdot 10^6$	$5-10 \cdot 10^6$	$<20 \cdot 10^6$	
Число пациентов	621	518	461	464	2064
Аномалии половых хромосом:					
X	82	8		–	90
Y	6	6 (1)*	4		16
Аутосомные аномалии:					
робертсоновские транслокации	2	18910*	8 (2)*	1	29
реципрокные транслокации	4 (1) **	8 (2)**(2)***	6 (1)** (1)***	1	19
Другие	–	4	4 (1)***	–	8
Общее количество	94	44	22	2	162
Процентное отношение	15,2	8,5	4,8	0,4	7,8

* Пренатальная диагностика.

** Случаи наличия хромосомной аномалии, зафиксированные в семейной истории.

*** Пренатальная диагностика после выявления сегрегации хромосомной перестройки в семье.

ем хромосомных аномалий (Bourrouillou et al., 1992, 1997) (табл. 2.12).

На рис. 2.7 представлены типы хромосомных аномалий, которые встречаются у мужчин с бесплодием.



Рис. 2.7. Типы хромосомных аномалий у мужчин с нарушением репродуктивной функции

Таблица 2.13. Варианты численных и структурных аномалий половых хромосом и их влияние на фенотип/сперматогенез у мужчин с нарушением репродуктивной функции

Кариотип	Патологическое состояние	Фенотип	Манифестация гонадная	Манифестация экстрагонадная	Сперматогенез
47,XXY и другие варианты увеличения количества хромосомы X или мозаицизм	Синдром Клайнфельтера	Мужской	Гипогонадизм, нарушение сперматогенеза	Гинекомастия, высокий рост	Отсутствие половых клеток или блокирование сперматогенеза на ранней стадии; отсутствие или небольшое количество сперматозоидов
47,XY	Мужчина с кариотипом 47,XY	Мужской	Возможно нарушение сперматогенеза	Отсутствуют нарушения	Присутствуют все стадии сперматогенеза, но пролиферация клеток варьирует
46,XX^{+SRY}	Синдром де ла Шапелля (мужчина с кариотипом 46,XX)	Мужской	Гипоспадия, крипторхизм	Гинекомастия, женское телосложение	Половые клетки отсутствуют, синдром "только клетки Сертоли"
XY/X мозаицизм	Смешанный гонадальный дисгенез	Мужской только в исключительных случаях	Интерсексуальные гениталии, реверсия пола с абдоминальным расположением яичек	Множественные экстрагонадные патологии	Половые клетки отсутствуют, синдром "только клетки Сертоли"

К вновь возникшим численным аномалиям половых хромосом относятся синдром Клайнфельтера (кариотип 47,XXY и различные мозаичные варианты), дисомия хромосомы Y и другие варианты YY-анеуплоидии, а также кариотип 45,X/46,XY (смешанная гонадальная дисгенезия). У мужчин с аномалиями гоносом отмечается отсутствие множественных пороков развития, задержка умственного развития наблюдается примерно в 1% случаев (С.Г. Ворсанова и др., 1998б). Варианты численных и структурных перестроек половых хромосом, а также их влияние на сперматогенез мужчины представлены в **табл. 2.13** и рассмотрены ниже.

Синдром Клайнфельтера встречается с частотой 1/500-700 новорожденных мальчиков (полные и мозаичные формы), среди спонтанных абортусов – 1/300, среди мужчин с бесплодием дисомию хромосомы X выявляют в 4-6% случаев (Diemer and Desjardins, 1999; Tachdjian et al., 2003). У мужчин с азооспермией указанный синдром отмечают в 11-14% случаев, с олигозооспермией – в 0,7% случаев (Huynh et al., 2002; Maduro and Lamb, 2002). Для синдрома Клайнфельтера характерна как полная

дисомия хромосомы X (90-93%), так и различные формы мозаицизма и варианты кариотипа: 48,XXX; 48,XXY; 49,XXXXY (7-10%) (С.Г. Ворсанова и др., 2006; Mark, 2000; Schinzel, 2001; Gardner and Sutherland, 2004) (**фото 2.1**).

При мозаичной форме синдрома Клайнфельтера описаны следующие варианты кариотипа: 47,XXY/46,XY (наиболее распространенный тип мозаицизма), 47,XXY/46,XX; 47,XXY/46,XX/46,XY (С.Г. Ворсанова и др., 1999; Zamora et al., 2002). В большинстве случаев наличие более двух клонов клеток обнаруживают с помощью FISH. Знание истинного процента мозаицизма в таких случаях имеет значение для установления процента аномальных половых клеток при оценке риска в ходе медико-генетического консультирования (Т.Э. Зерова-Любимова и др., 2005а,б; Zamora et al., 2002).

При синдроме Клайнфельтера описаны также отдельные случаи структурных перестроек хромосомы X, а именно изохромосомы по длинному плечу (кариотип 47,XY,i(Xq)) и отдельные случаи изохромосомы X по короткому плечу (Arps et al., 1996) (**фото 2.2-2.4**).

Характерными признаками синдрома Клайнфельтера являются евнухоидное телосложение, гинекомастия, крипторхизм, повышенный уровень ФСГ и азооспермия. Как правило, новорожденные мальчики не отличаются от здоровых, лишь иногда наблюдают задержку психомоторного развития и гипоплазию яичек, а при исследовании мазков слизистой оболочки рта могут быть выявлены хроматин-положительные ядра. Основные клинические черты проявляются в препубертатном и пубертатном возрасте. Отмечают следующие признаки: неправильную форму черепа, деформацию ушных раковин, алопецию, катаракту, прогнатия, евнухоидный габитус с длинными ногами, узкими плечами и тазом, отложение жира на бедрах, груди, в нижней части живота, поперечную складку на ладони, сколиоз, неврологические нарушения, пороки сердца, выраженную гипоплазию яичек и предстательной железы, крипторхизм. В среднем рост таких пациентов соответствует росту здоровых мужчин. Объем эякулята редко достигает 1,5 мл. Отмечают азооспермию или олигозооспермию тяжелой степени, гистологическое исследование среза яичка демонстрирует гиперплазию клеток Лейдига, гиалиноз семенных канальцев, у некоторых мужчин с синдромом Клайнфельтера, особенно при его мозаичной форме, в эякуляте обнаруживают сперматозоиды. Для пациентов с этим синдромом характерен нормальный или повышенный уровень эстрадиола, нормальный или низкий с тенденцией к снижению с возрастом уровень тестостерона, повышенный уровень ФСГ. Около 15% мужчин страдают олигофренией, в основном, в степени легкой дебилности. При более тяжелом нарушении интеллекта отмечают аутизм, склонность к алкоголизму, асоциальное поведение. Последующее увеличение количества хромосом X ведет, как правило, к более тяжелой умственной отсталости, широкому спектру пороков и микроаномалий развития. Так, больные с кариотипом 49,XXXXY страдают тяжелой олигофренией, отмечается также комплекс резко выраженных нарушений: пренатальная гипотрофия, задержка роста, лицевые аномалии (гипертелоризм, эпикант, плоская спинка носа, косоглазие, близорукость), аномалии ушных раковин, прогнатия, клинодактилия мизин-

цев, плоскостопие. В гонадах отсутствуют половые клетки, наблюдается гипоплазия интерстициальных клеток.

Описаны также варианты синдрома Клайнфельтера с кариотипами 48,XXYY и 48,XXXU, которые встречаются с частотой 1/17 000-50 000 новорожденных мальчиков (Visoosak and Graham, 2006). У носителей такого кариотипа рост выше среднего, отмечают незначительные скелетные аномалии.

Для носителей мозаичных вариантов синдрома Клайнфельтера характерна более стертая клиническая картина (яички в большинстве случаев имеют нормальный размер, отсутствует крипторхизм). В пубертатном периоде наблюдается сперматогенез, однако вскоре после пубертата происходит гиалиновое перерождение семенных канальцев, что, в конечном счете, приводит к бесплодию. Для мужчин с мозаичной формой синдрома характерна олигозооспермия.

Помимо численных изменений хромосомы X и мозаичных вариантов синдрома Клайнфельтера, известны отдельные случаи наличия в кариотипе других хромосомных аномалий (Nemeth et al., 2002) **(фото 2.5)**.

Согласно А. Шинзелу синдром Клайнфельтера – это единственное наследственное заболевание, связанное с анеуплоидией, при котором в нерасхождении хромосомы X в равной степени участие принимают как отец, так и мать (50/50) (Schinzel, 2001). В то же время, по данным отдельных авторов мейотическое нерасхождение происходит в 2/3 случаев у матери и только в 1/3 случаев присутствующая дополнительная хромосома X имеет отцовское происхождение (Nieschlag, 1997; Diemer and Desjardins, 1999; Hargreave, 2000; Thomas et al., 2000; Iitsuka et al., 2001; Shah et al., 2003). При кариотипе 48,XXYY три половые хромосомы имеют отцовское происхождение, а при кариотипе 49,XXXXX и 49,XXXXU четыре хромосомы X наследуются от матери (Robinson et al., 1994; Schinzel, 2001). При отцовском наследовании отмечают характерную особенность: отцы пациентов принадлежат к старшей возрастной группе. При материнском наследовании женщины с нерасхождением в первом мейотическом делении

старше женщин с нерасхождением во втором мейотическом делении.

При молекулярно-цитогенетическом анализе сперматозоидов, полученных с помощью инвазивных методов (PESA, TESA, MESA, TESE), у пациентов с синдромом Клайнфельтера выявляют повышенное количество сперматозоидов с XY-дисомией, что можно объяснить потерей способности к рекомбинации между хромосомами X и Y во время мейоза I (Hassold et al., 1991; Bielanska et al., 2000; Blanco et al., 2001; Shah et al., 2003).

Ранее считалось, что сперматозоиды, обнаруживаемые при мозаичном варианте синдрома Клайнфельтера, имеют нормальный хромосомный набор, однако более поздние исследования показали, что у таких пациентов повышено содержание гипергаплоидных сперматозоидов с кариотипом 24,XY (Cozzi et al., 1994; Chevret et al., 1996; Martini et al., 1996; Huynh et al., 2002). Анализ сперматозоидов мужчин с синдромом Клайнфельтера с помощью FISH показал повышенный, 2-20%, уровень анеуплоидии половых хромосом (Foresta et al., 1998b; Diemer and Desjardins, 1999). Таким образом, клетки с кариотипом 47,XXY могут участвовать в мейозе и формировать сперматозоиды. Однако вопрос о том, происходят ли гипергаплоидные гаметы от XXY-герминативных клеток, или же они являются результатом повышенного уровня мейотического нерасхождения, до сих пор остается спорным (Bhasin et al., 2000; Huynh et al., 2002).

Несмотря на то, что большинство мужчин с синдромом Клайнфельтера бесплодны (азооспермия), в настоящее время растет количество сообщений о рождении детей у таких пациентов (Okada et al., 1999; Schiff et al., 2005; Visootsak and Graham, 2006). Процедура получения тестикулярных сперматозоидов и использование технологии ICSI обеспечивают наступление беременности в семьях пациентов с синдромом Клайнфельтера (Greco et al., 2001; Denschlag et al., 2004). Однако необходимо тщательно подходить к оценке хромосомного набора у эмбрионов/плодов таких пациентов в связи с повышенным риском аномального кариотипа (Т.Э. Зерова-Любимова и др., 2005). Таким супружеским парам рекомендуют

ПГД и пренатальную диагностику плода для исключения хромосомной патологии.

Синдром дисомии хромосомы Y и другие варианты ploидности хромосомы Y представляют второй тип анеуплоидии гоносом, встречающийся у мужчин с частотой 1/1000 (С.Г. Ворсанова и др., 2006; Robinson and Jacobs, 1999; Mark, 2000; Schinzel, 2001; Maduro and Lamb, 2002; Shah et al., 2003; Gardner and Sutherland, 2004; Milazzo et al., 2006). Частота встречаемости дисомии хромосомы Y у мужчин с разными психическими отклонениями и асоциальным поведением колеблется от 0,45 до 15% (Schinzel, 2001). Носителей дисомии хромосомы Y выявляют в связи с рождением в семье ребенка с синдромом Дауна или другими анеуплоидиями. У мужчин с дисомией хромосомы Y показатели спермограммы могут варьировать от нормозооспермии до азооспермии (как и в общей популяции) (Egozcue et al., 2000) (**фото 2.6, 2.7**). Более чем у 30% пациентов с кариотипом 47,XXY наблюдают аномалию функционирования репродуктивной системы, заключающуюся в нарушении сперматогенеза (Maduro and Lamb, 2002). Снижение продуцирования сперматозоидов обусловлено остановкой сперматогенеза большинства YY-гипергаплоидных половых клеток в связи с аномальной конъюгацией хромосом во время мейоза (Kent-First, 2000).

Дисомия хромосомы Y в кариотипе может быть представлена и в мозаичном варианте; среди выявленных клеточных линий описаны 45,X; 46,XY; 47,XXY и 48,XXYY (С.Г. Ворсанова и др., 2006) (**фото 2.8, 2.9**). Известны и другие варианты мозаицизма: 45,X/49,XYYY; 47,XY/48,XYYY/49,XYYY, а также 48,XYYY/46,XY. Для таких мужчин характерны следующие признаки: неонатальная асфиксия при рождении, умственная отсталость, ожирение, азооспермия, вызванная атрофией семенных канальцев и полным отсутствием сперматогенеза.

В большинстве случаев дисомия хромосомы Y обусловлена отцовским нерасхождением в мейозе II (Shah et al., 2003). Анализ сперматозоидов с помощью FISH у мужчин с указанным кариотипом показал значительное увеличение числа дисомных XY- и YY-сперматозоидов (0,35 и 0,43%, соответ-

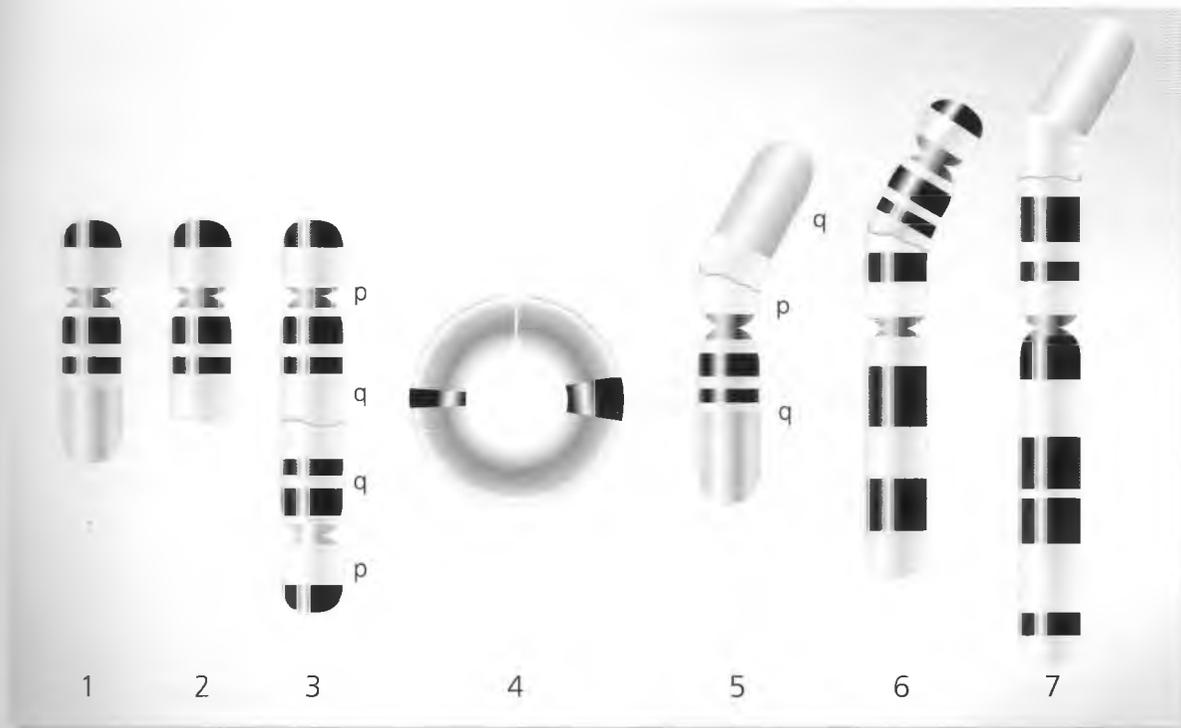


Рис. 2.8. Наиболее распространенные варианты хромосомных перестроек, в которых задействован участок хромосомы Yq11. Идиограмма:

- 1 – хромосома Y; 2 – делеция длинного плеча хромосомы Y;
- 3 – дицентрическая хромосома Y; 4 – кольцевая хромосома Y;
- 5 – транслокация, в которой задействованы две хромосомы Y;
- 6 – транслокация между хромосомой Y с потерей гетерохроматинового блока и аутосомой;
- 7 – транслокация между хромосомой Y с потерей короткого плеча и аутосомой.

ственно, по сравнению с 0,11 и 0,16% в контроле) при отсутствии увеличения количества сперматозоидов с дисомией хромосомы X (Han et al., 1994; Egozcue et al., 2000). Риск рождения ребенка с трисомией у таких мужчин повышен и может быть оценен на основании соотношения количества гипергаплоидных сперматозоидов к числу нормальных половых клеток в эякуляте (Blanco et al., 1997; Chevret et al., 1997; Diemer and Desjardins, 1999; Shah et al., 2003). Технология ICSI позволяет носителем несбалансированного кариотипа иметь ребенка (детей), однако необходимо проведение медико-генетического консультирования и последующей преимплантационной и/или пренатальной диагностики.

Тем смешанной дисгенезии гонад характеризуются фенотипической манифестацией варьирует в широком диапазоне: больные могут быть женщинами со стигмами синдрома Шерешевского–Тернера, мужчинами с нормальным фенотипом, мужчинами со смешанной гонадальной дисгенезией

и/или иметь двойственные гениталии. Пол определяется по присутствующим при рождении гениталиям. У пациентов при обследовании выявляют с одной стороны яичко, а с другой – гонадный тяж. Если во внутриутробном периоде яичко функционирует, формируются наружные половые органы промежуточного типа. Расположение яичка, равно как и гонадного тяжа, наиболее часто абдоминальное, в некоторых случаях обе гонады находятся в мошонке. Гонадный тяж расположен в широкой связке или на тазовой стенке, состоит из стромы яичника. В пубертатном периоде яичко начинает секретировать андрогены, происходит вирилизация. В постпубертатном периоде при проведении гистологического исследования яичка обнаруживают зрелые клетки Лейдига, а семенные каналцы содержат только клетки Сертоли. Таким пациентам свойственна высокая вероятность малигнизации, гонадобластому или дисгерминому наблюдают в 20-50% случаев (Mark and Deveau, 2001; Maduro and Lamb, 2002).

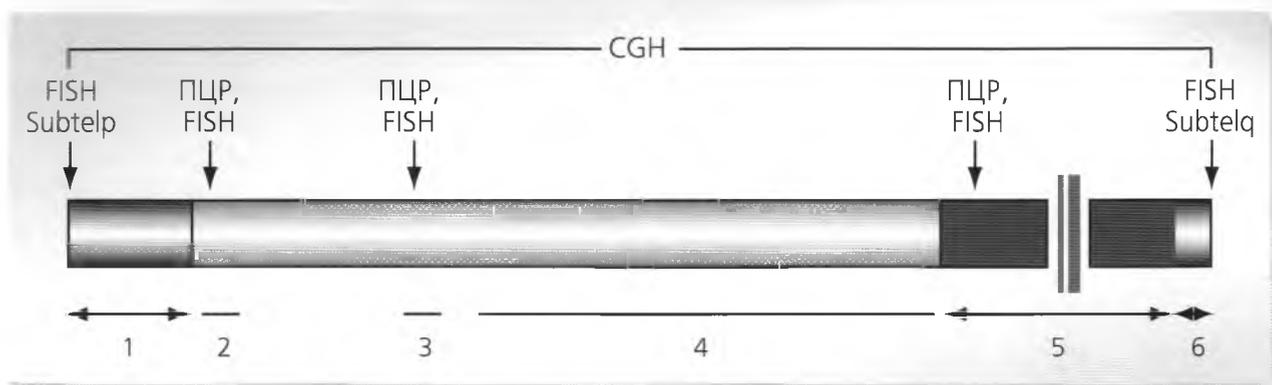


Рис. 2.9. Современные методы выявления и идентификации хромосомных перестроек в хромосоме Y:

- 1 – участок PAR1; 2 – ген *SRY*; 3 – центромерный район;
- 4 – участок локуса AZF; 5 – гетерохроматиновый участок;
- 6 – участок PAR2.

Цитогенетический анализ показывает наличие в 2/3 случаев кариотипа 45,X/46,XY и в 1/3 – кариотипа 46,XY. Направление полового развития зависит от количества клеток с кариотипом 46,XY. Митотическая потеря хромосомы Y во время раннего эмбрионального развития объясняет наличие мозаицизма 45,X/46,XY в кариотипе таких пациентов (Maduro and Lamb, 2002). Фенотип варьирует в зависимости от уровня мозаицизма, который определяется моментом митотической ошибки в эмбриональном периоде, а также соотношением клеточной линии с аномальным кариотипом к клеточной линии с нормальным кариотипом (Kent-First, 2000). Поскольку смешанная гонадальная дисгенезия сопровождается как мозаичным вариантом, так и нормальным мужским кариотипом, принято считать, что этиология синдрома неоднородна, и неполное развитие яичек может происходить в результате ошибок во время детерминации пола или половой дифференцировки, что рассмотрено ниже.

Известны следующие **структурные аномалии половых хромосом** при бесплодии у мужчин: структурные аномалии хромосомы Y, хромосомы X, реципрокные транслокации гоносом, гоносом и аутосом. В большинстве случаев при бесплодии у мужчин наблюдают aberrации хромосомы Y. Среди них известны следующие: делеция короткого плеча хромосомы Y, делеция длинного плеча хромосомы Y, кольцевая хромосома Y, изо- или изодицентрическая хромосома по

короткому плечу хромосомы Y, изо- или изодицентрическая хромосома по длинному плечу хромосомы Y, перидцентрическая инверсия хромосомы Y, инвертированная дупликация (С.Г. Ворсанова и др., 1998б, 1999, 2006; Bofinger et al., 1999; Tzancheva et al., 1999; Rottger et al., 2000; Siffroi et al., 2000; Schinzel, 2001; Cruger et al., 2003; Gardner and Sutherland, 2004; Arnedo et al., 2005) (**рис. 2.8**). В 60% случаев структурная перестройка хромосомы Y присутствует в мозаичном варианте, вторая клеточная линия представлена в виде кариотипа 45,X (Siffroi et al., 2000).

Современные молекулярно-цитогенетические и молекулярные методы позволяют идентифицировать структурные аномалии хромосомы Y (**рис. 2.9**).

Все структурные аномалии хромосомы Y сопровождаются азооспермией, в отдельных случаях – олигозооспермией, обуславливая нарушение процесса сперматогенеза, которое варьирует от потери способности к дифференциации сперматогониев до количественных потерь при формировании постмейотических половых клеток (Diemer and Desjardins, 1999). Нарушения сперматогенеза при структурных аномалиях хромосомы Y могут быть следствием делеции или мутации генов локуса AZF, локализованного в длинном плече хромосомы Y, а в некоторых случаях структурная перестройка хромосомы Y может влиять на конъюгацию хромосом X и Y в метафазе

мейоза I, нарушая сперматогенез (Diemer and Desjardins, 1999). Перестройки, в которых участвует хромосома Y, способны инактивировать расположенные в ней гены или препятствовать расхождению хромосом во время мейотического деления (Mark and Deveau, 2001).

При формировании дицентрической хромосомы Y, в состав которой входят короткие плечи хромосомы Y, а также при формировании кольцевой хромосомы, образующейся в результате потери значительной части q-плеча хромосомы Y (в котором находится локус AZF), происходит также нарушение сперматогенеза – сперматогонии теряют способность дифференцироваться. В большинстве случаев прерывание дифференцировки половых клеток происходит до формирования сперматид, но в некоторых случаях при биопсии яичка можно обнаружить элонгированные сперматиды, которые используют в процедуре ICSI (Diemer and Desjardins, 1999).

У мужчин структурные аномалии хромосомы X описаны только в отдельных случаях (перичентрическая инверсия хромосомы X сопровождается бесплодием, фенотип синдрома Клайнфельтера отсутствует; парацентрическая инверсия q-плеча хромосомы X выявлена у мужчины со стигмами синдрома Клайнфельтера и бесплодием) (Schinzel, 2001; Nemeth et al., 2002).

Известны три типа транслокаций между хромосомами X и Y. Первый тип транслокаций – перенос последовательностей p-плеча хромосомы Y, включая ген *SRY*, на терминальный участок p-плеча хромосомы X, что характерно для синдрома де ла Шапелля и в редких случаях – для 46,XX истинного гермафродитизма (McElreavey and Cortes, 2001). Второй тип включает сбалансированные транслокации, происходящие между q-плечом хромосомы Y (участок Yq11) и p-плечом хромосомы X (участок p23.3-pter). Указанный тип транслокации сопровождается 46,XY полным или частичным гонадальным дисгенезом. При третьем, редком типе транслокаций между хромосомами X и Y происходит обмен участками Yp-Xq, кариотип 46,XX (McElreavey and Cortes, 2001). Транслокации, в которых участвуют хромосомы X и Y, часто обуславливают ано-

мальное развитие гонад у их носителей.

Примерно у 2% мужчин, которые обращаются за медицинской помощью в связи с нарушением репродуктивной функции, отмечают кариотип 46,XX (С.Ю. Калиниченко и др., 2003; Nieschlag et al., 1997; Diemer and Desjardins, 1999; Kent-First, 2000). Впервые данное патологическое состояние было описано де ла Шапеллем в 1972 г. Его определяют как **синдром де ла Шапелля**, или синдром 46,XX-мужчина (синдром гипогонадизма у пациентов с мужским фенотипом и кариотипом 46,XX) (MIM 278850) (De la Chapelle, 1972; Schinzel, 2001). Синдром встречается с частотой 1/9 000-20 000 новорожденных мальчиков (De la Chapelle, 1972; Nielsen and Sillesen, 1975; Kent-First, 2000). Большинство случаев спорадичные.

Несмотря на кариотип 46,XX, мужчины маскулинизированы, что объясняется наличием гена *SRY*, который отвечает за развитие яичек. Ген *SRY* выявляют молекулярным и молекулярно-цитогенетическим методами, с помощью последнего на одной из хромосом X (дериватной хромосоме X) визуализируют материал хромосомы Y (**фото 2.10**).

Фенотип мужчин с синдромом де ла Шапелля мужской, в большинстве случаев наружные гениталии нормальные, но у 10-15% наблюдают различную степень гипоспадии. Клинические проявления этого синдрома напоминают клиническую картину синдрома Клайнфельтера: гипогонадизм, крипторхизм, гиалиноз семявыносящих протоков, азооспермия. Вторичные половые признаки у таких мужчин четко дифференцированы, однако для них характерны гинекомастия и женское телосложение. Большинство мужчин с кариотипом 46,XX имеют только клетки Сертоли. Азооспермия у таких мужчин объясняется отсутствием генов хромосомы Y, отвечающих за сперматогенез, в результате чего процесс прерывания сперматогенеза происходит до формирования сперматид (Л.Ф. Курило и др., 1994; Г.Р. Осипова и др., 2001; Tiepolo and Zuffardi, 1976; Cooper and Sandlow, 1996; Vogt et al., 1996; Diemer and Desjardins, 1999).

Различают две формы синдрома де ла Шапелля – *SRY*-положительную ("Y ДНК-поло-

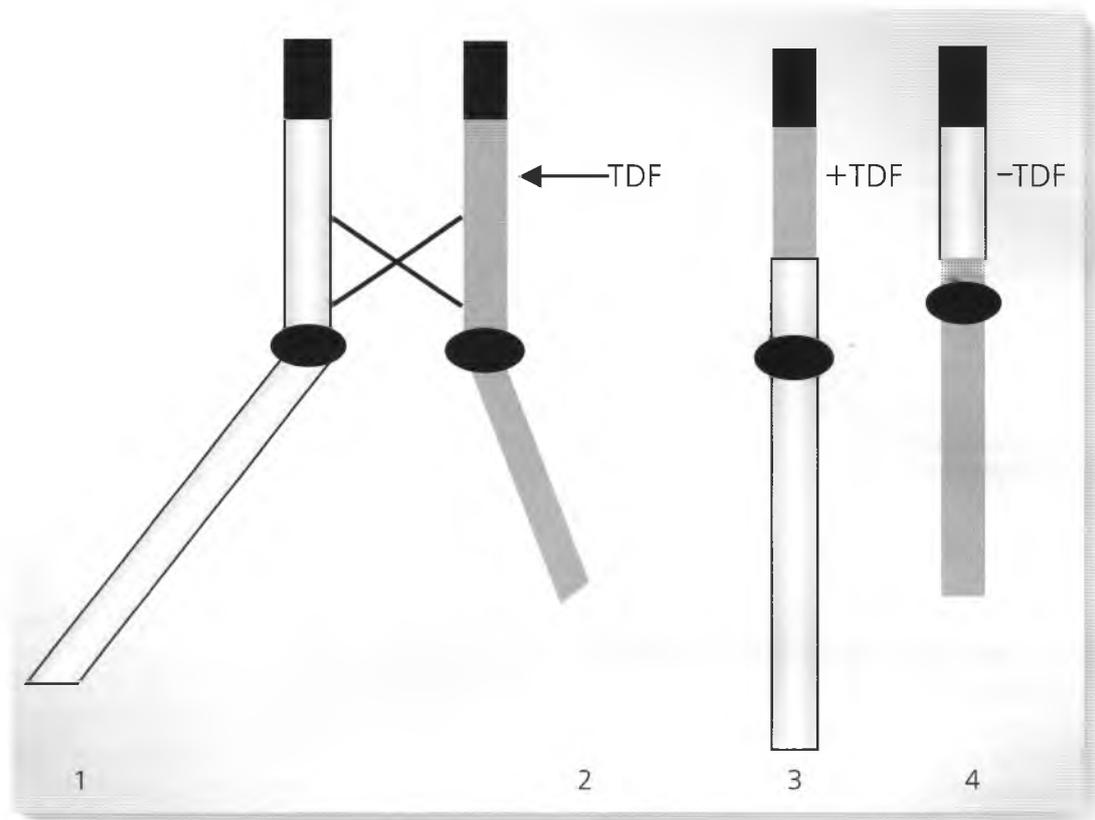


Рис. 2.10. Механизм возникновения неравного X–Y обмена во время мейотического деления согласно гипотезе, предложенной М. Фергюсоном-Смитом (цит. по Ferguson-Smith, 1966):

1 – хромосома X; 2 – хромосома Y; 3 – структурная перестройка между хромосомами X и Y у мужчины с кариотипом 46,XX; 4 – структурная перестройка между хромосомами X и Y у женщины с кариотипом 46,XY; TDF – Testis Determining Factor.

жительная") и *SRY*-отрицательную ("Y ДНК-отрицательная") (соответственно 75-80% и 20-25% мужчин) (С.Ю. Калинченко и др., 2003; Abusheikha et al., 2001). Первая форма синдрома возникает в результате мейотической рекомбинации между хромосомами X и Y у мужчины. Впервые гипотезу о возникновении мужского фенотипа при синдроме де ла Шапелля высказал М. Фергюсон-Смит в 1966 г. (Ferguson-Smith, 1966). Ученый предположил, что мужской фенотип у XX-мужчины является результатом сбалансированного aberrантного негомологичного обмена между р-плечами хромосомы X и хромосомы Y (рис. 2.10).

Участок короткого плеча хромосомы Y, задействованного в обмене, варьирует: чем больше материала короткого плеча хромосомы Y участвует в транслокации, тем более вирилизированным оказывается фенотип мужчины (Sharp et al., 2005). Подтверждени-

ем гипотезы М. Фергюсона-Смита стали цитогенетические и молекулярно-цитогенетические находки, показавшие наличие дополнительного материала на одной из хромосом X у некоторых мужчин с кариотипом 46,XX (Rigola et al., 2002).

Вторую форму наблюдают у 20-25% пациентов с синдромом де ла Шапелля, для них характерно двойственное строение наружных гениталий; у таких мужчин описаны случаи наличия точковых мутаций в гене *SRY* (Kent-First, 2000).

Молекулярный анализ и FISH – высоко информативные методы выявления и локализации последовательностей хромосомы Y у XX-мужчин, которые позволяют проводить точную диагностику и выбирать правильную тактику лечения больного.

Транслокации между хромосомой Y и

аутосомами подразделяются на группы в зависимости от точки разрыва в хромосоме Y и/или от аутосомы, вовлеченной в транслокацию. Наиболее часто среди аутосом в перестройке принимают участие акроцентрические хромосомы, в большинстве случаев точки разрыва находятся на р-плечах акроцентрических хромосом и в гетерохроматиновом участке q-плеча хромосомы Y (Yqh или Yq12) (Hsu, 1994; Brisset et al., 2005). Этот тип транслокации сопровождается наличием в кариотипе мужчины маленькой делетированной хромосомы Y и присутствием гетерохроматинового блока хромосомы Y на коротких плечах акроцентрической хромосомы (дериватная хромосома выглядит как субметацентрическая). В большинстве случаев такие транслокации сбалансированные, семейные и не вызывают клинических проявлений. Нарушение репродуктивной функции обусловлено наличием точки разрыва в хромосоме Y, а именно в дистальной или медиальной части района q12, что приводит к повреждению локуса AZF (Chandley, 1988; Buonadonna et al., 2002). Транслокации хромосомы Y с другими, отличными от акроцентрических хромосом, аутосомами могут быть как сбалансированными, так и несбалансированными реципрокными (**фото 2.11**). Наиболее часто в транслокации с хромосомой Y задействованы аутосомы 1, 3, 6, 16, 19. Разрыв в хромосоме Y чаще всего происходит в участках Yq11 или Yq12. У носителей транслокации между хромосомой Y и какой-либо из аутосом нарушение репродуктивной функции можно объяснить следствием перестройки, в результате которой происходит потеря эухроматинового участка с локализованным в нем локусом AZF. Если этот участок не задействован в транслокации и присутствует весь эухроматин, нарушение сперматогенеза может происходить в результате аномального поведения aberrantных хромосом во время мейоза, нарушения их конъюгации и неполной инактивации хромосомы X, что приводит к прерыванию мейоза и дегенерации сперматоцитов (Siffroi et al., 2000; Pabst et al., 2002).

Мозаицизм по трисомии хромосомы 21 или хромосомы 18 был зафиксирован различными группами исследователей при анализе супружеских пар с нарушением

репродуктивной функции (самопроизвольное прерывание беременности, бесплодие), а также при рождении детей с синдромом Дауна или Эдвардса (Gersdorf et al., 1990; Peschka et al., 1999; Rivera et al., 2002; Bettio et al., 2006). Такой мозаицизм наблюдается в незначительном проценте клеток (4-10%) и может быть не выявлен при цитогенетическом анализе, однако его наличие необходимо принимать во внимание при медико-генетическом консультировании семьи (**фото 2.12-2.14**).

Структурные аномалии аутосом выявляют у их носителей в связи с бесплодием или наличием в анамнезе спонтанного(-ых) аборта(-ов), рождением ребенка (детей) с несбалансированной хромосомной перестройкой, которая обуславливает потенциальный риск возникновения гамет с несбалансированным набором хромосом. Предположение о возможной связи между нарушением репродуктивной функции у мужчин и наличием у таких пациентов хромосомных аномалий, в основном транслокаций, было высказано более 30 лет назад (Chandley et al., 1975, 1976). Однако методы, которые использовались ранее, не позволяли установить эту зависимость.

Структурные перестройки аутосом включают робертсоновские и реципрокные транслокации, пара- и перичентрические инверсии, дополнительные маркерные хромосомы. Реципрокные транслокации и перичентрические инверсии встречаются в 7-13 раз чаще, маркерные хромосомы – в 8 раз чаще у мужчин с нарушением репродуктивной функции по сравнению с контрольной группой, а частота возникновения робертсоновских транслокаций составляет 1/100 среди мужчин и женщин с нарушением репродуктивной функции, тогда как среди новорожденных – 1/1000 (De Braekeleer and Dao, 1991; Therman and Susman, 1993; Mau et al., 1997; Munne et al., 2000; Huynh et al., 2002; Maduro and Lamb, 2002). У женщин, носительниц робертсоновских транслокаций, в анамнезе выявляют самопроизвольные аборт, тогда как у мужчин – бесплодие. Для носителей данного типа транслокации характерно полное или частичное блокирование сперматогенеза. Нарушения сперматогенеза варьируют от значительно до незначительно сниженного числа сперматогониев

и даже до отсутствия изменений в эпителии семявыносящих протоков – наблюдается различной степени олигозооспермия или азооспермия (Johannisson et al., 1993; Meschede et al., 1998; Diemer and Desjardins, 1999; Anton et al., 2004; Clementini et al., 2005) (**фото 2.15-2.19**). Так, в литературе описан случай робертсоновской транслокации между хромосомами 13 и 14 у отца и сына, при этом у отца нарушения сперматогенеза отсутствовали, тогда как у сына наблюдалась дисфункция репродуктивной системы (Johannisson et al., 1993). У большинства мужчин, носителей робертсоновской транслокации, отмечают олигозооспермию, тогда как при азооспермии указанный тип транслокации выявляют крайне редко. Уровень ФСГ у носителей транслокации может быть повышен, что также характерно для мужчин с нарушением сперматогенеза (Diemer and Desjardins, 1999).

Нарушение сегрегации хромосом у носителей робертсоновской транслокации может быть следующим. Во время профазы первого мейотического деления дериватная хромосома и две нормальные гомологичные хромосомы образуют тривалент. При альтернативной (alternative) сегрегации хромосом образуются нормальные и сбалансированные гаметы, тогда как при совместной (adjacent) сегрегации – две дисомные и две нуллисомные гаметы (**рис. 1.29**). При анализе сперматозоидов на стадии профазы мейоза I у носителей робертсоновских транслокаций было выявлено преобладание цис-конфигурации структуры мейотического тривалента, что приводит к альтернативной сегрегации и образованию гамет с нормальным и сбалансированным кариотипом (Guichaoua et al., 1990; Mau et al., 1997; Shi and Martin, 2000). От 3 до 27% сперматозоидов мужчин, носителей робертсоновских транслокаций, имеют несбалансированный набор хромосом (Pellestor et al., 1987; Martin and Rademaker, 1995; Escudero et al., 2000; Munne et al., 2000; Shi and Martin, 2000). Предположение о возможном влиянии хромосомной перестройки на поведение других хромосом во время мейоза – межхромосомный эффект – было высказано еще в 1965 г. Ж. Леженом (Lejeune, 1965). Указанный феномен подразумевает влия-

ние дериватной хромосомы на сегрегацию других хромосом, не вовлеченных в перестройку (Baccetti et al., 2005). С. Руссо и соавт. одними из первых выявили значительное увеличение частоты XY-дисомии в сперматозоидах мужчин с робертсоновской транслокацией между хромосомами 14 и 21, что в дальнейшем было подтверждено другими исследователями (Rousseaux et al., 1995; Yurov et al., 1996; Pellestor et al., 2001; Baccetti et al., 2005; Gutierrez-Mateo et al., 2005).

Инверсии хромосом встречаются значительно реже, чем другие хромосомные перестройки; их частота у взрослых мужчин составляет 0,01% (Diemer and Desjardins, 1999). Среди аутосом, вовлеченных в инверсии, отмечают хромосомы 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 20, 21 (Navarro et al., 1993; Meschede et al., 1994б; Diemer and Desjardins, 1999).

Степень воздействия пери- и парацентрических инверсий в кариотипе мужчин на ход сперматогенеза варьирует в каждом отдельном случае (Navarro et al., 1993; Meschede et al., 1994б; Diemer and Desjardins, 1999). Парацентрические инверсии хромосом 1, 3, 5, 6 и 10 могут нарушать ход мейоза, приводя к нарушению сперматогенеза и, соответственно, к бесплодию (Huynh et al., 2002). Описаны случаи прерывания процесса сперматогенеза на стадии образования сперматоцитов у мужчин с перицентрической инверсией хромосомы 1 (район р34q23) (Meschede et al., 1994б). В других случаях перицентрические инверсии были обнаружены у мужчин с тяжелой олигозооспермией или азооспермией (Meschede et al., 1998; Diemer and Desjardins, 1999).

Роль маркерных хромосом в нарушении репродуктивной функции человека до конца не установлена, поскольку частота их встречаемости достаточно низка – 2,5/1000 случаев, тогда как в контрольной группе – 0,13/1000 (С.Г. Ворсанова и др., 2006; Buckton et al., 1985; Kumar et al., 1997). Впервые маркерная хромосома у мужчины с олигозооспермией была описана в 1965 г. (Smith et al., 1965). Среди случаев, выявленных у мужчин с нарушением репродуктивной функции, наиболее часто (90%) маркерные хромосомы являются

производными коротких плеч акроцентрических хромосом, в частности хромосом 15 и 22 (Mau et al., 1997; Tuerlings et al., 1998; Eggermann et al., 2002). Дополнительная маркерная хромосома нарушает процесс сперматогенеза, приводя к бесплодию (Kumar et al., 1997; McNerlan et al., 2003).

Наличие дополнительной маркерной хромосомы в кариотипе у мужчины необходимо учитывать при использовании ВРТ и в последующей пренатальной диагностике плода.

Для носителей сбалансированных перестроек характерны: бесплодие, наличие повторных самопроизвольных абортов в анамнезе, рождение ребенка (детей) с несбалансированным кариотипом и врожденными пороками развития. В реципрокные и сбалансированные транслокации могут быть вовлечены все аутосомы, наиболее часто встречается транслокация между хромосомами 11 и 22 (Meschede et al., 1994b; Bugge et al., 2000; Escudero et al., 2003) (**фото 1.15д, 2.20-2.22**). Хромосома 1, а именно участок q21, наиболее часто встречается среди структурных перестроек у мужчин с бесплодием (выявляют транслокации, пери- и парацентрические инверсии) (Bache et al., 2004; Schmid et al., 2004). При транслокациях между двумя большими метацентрическими хромосомами с точками разрыва ближе к центромере хромосомы имеют тенденцию к образованию закрытой конфигурации типа кольцевой хромосомы на стадии метафазы мейоза I (сегрегация 2:2). В таких случаях количество сперматозоидов с несбалансированным кариотипом меньше, чем аналогичных с транслокациями других типов (Escudero et al., 2003). При транслокациях с участием хромосом групп E и F, акроцентрических хромосом или тех, у которых точки разрыва находятся вблизи теломерных участков, хромосомы имеют тенденцию к образованию открытых конфигураций типа цепочки, которой свойственна сегрегация 3:1. В таких случаях наблюдается значительно большее количество гамет с несбалансированным кариотипом (Vaccetti et al., 2003; Escudero et al., 2003). Изучение поведения хромосом на стадии пахитены мейоза позволило найти ключ к пониманию механизмов, которые лежат в основе мужского бесплодия, обусловленного аутосомными транслокациями. Для аберрантных

хромосом характерны следующие признаки: отсутствие синапсиса в районе точек разрыва; их ассоциация с половыми хромосомами (Lespinasse et al., 2003).

Сложные структурные перестройки представляют собой реципрокные обмены между тремя и более хромосомами, возникают *de novo*, описаны в отдельных случаях у мужчин с нарушением репродуктивной функции. Единичные случаи выявлены в связи с наличием в анамнезе самопроизвольных абортов, рождением в семье ребенка (детей) с множественными пороками развития, что обусловлено нарушением сперматогенеза или хромосомным дисбалансом в гаметях у отца (Chandley et al., 1975; Madan et al., 1997; Siffroi et al., 1997; Cai et al., 2001; Lespinasse et al., 2003).

Цитогенетический и молекулярно-цитогенетический анализы сперматозоидов и исследования с помощью FISH позволили установить частоту встречаемости сперматозоидов с несбалансированным кариотипом у носителей реципрокных транслокаций, которая составляет около 50% с небольшим дополнительным риском за счет интерхромосомного эффекта (Shi and Martin, 2001; Yogeve et al., 2002).

Хромосомный гетероморфизм подразумевает вариабельность длины и расположения гетерохроматиновых сегментов, спутничных нитей и спутников и согласно ISCN является вариантом нормы (**фото 1.3-1.5, 2.23**).

Хромосомный гетероморфизм встречается в здоровой популяции, у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции, а также в семьях с репродуктивными потерями или имеющих ребенка с множественными пороками развития (Jobling et al., 1996). У супружеских пар с нарушением репродуктивной функции наблюдают повышенную частоту хромосомного гетероморфизма, наиболее часто отмечают перичентрическую инверсию сегментов p12q13 хромосомы 9, общепопуляционная частота которой составляет 1-1,65% (Teo et al., 1995; Wiland et al., 2002). Принято считать, что указанный тип инверсии не влияет на репродуктивную функцию, однако до сих пор его роль остается спорной, высказываются предположения

об эффекте положения генов, интерхромосомном эффекте (Bobrow, 1985; Uehara et al., 1992; Amiel et al., 2001). Перичентрическую инверсию выявляют у мужчин с различными показателями спермограммы, при этом не обнаружено четкой зависимости между цитогенетической находкой и показателями спермиологического анализа.

Молекулярно-цитогенетический анализ с целью выявления дисомных клеток по хромосомам 8, 9, 18, X и Y у мужчины с перичентрической инверсией хромосомы 9 и конститутивным гетерохроматином показал, что уровень дисомии для этих хромосом значительно выше, чем в контроле, при этом преобладает дисомия хромосомы 9 (Amiel et al., 2001). Вместе с тем, межхромосомный эффект для хромосомы 21 при анализе сперматозоидов мужчин с упомянутой инверсией не наблюдался (Colls et al., 1997).

Ломкие (фрагильные) сайты определенных хромосомных сегментов рассматриваются как варианты нормы и могут быть также выявлены у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции. Наиболее часто фрагильные участки наблюдают в хромосомах 6 (участок q13), 10 (участок q24), 16 (участок q22.1) и 17 (участок p12) (Peschka et al., 1999; ISCN, 2005) (**фото 1.6, 1.7**). Отдельно выделяют синдром ломкой хромосомы X.

Наличие ломких сайтов может приводить к хромосомным аномалиям, в том числе делециям, ацентрическим фрагментам, много радиальным фигурам. Их роль в возникновении бесплодия у мужчины не установлена и требует дальнейшего исследования.

Хромосомные аномалии выявляют как в соматических и половых клетках организма, так и исключительно в половых клетках. Возникновение хромосомных aberrаций в гаметах обусловлено митотическими или мейотическими ошибками в результате нарушения сперматогенеза (Н.М. Слозина и Е.Г. Неронова, 1992; Л.Ф. Курило и др., 1995, 1997, 1998; Л.Ф. Курило, 1998; Л.Ф. Курило и О.Л. Коломиец, 2001; А.П. Савельева и др., 2001; И.Д. Федорова и др., 2003; Miharu et al., 1994; Martin and Rademaker, 1995; Martin et al., 1996;

Pellestor et al., 2002a,б).

Исследования **хромосомных аномалий в сперматозоидах** человека стали возможны благодаря развитию техники гетерологического оплодотворения ооцитов золотистого хомячка сперматозоидами человека. Методика первоначально была описана Е. Рудак и соавт. и получила широкое распространение благодаря работе нескольких исследовательских групп (Rudak et al., 1978; Brandriff et al., 1985; Martin et al., 1991). Суть методики состоит в том, что ооциты хомячка, полученные благодаря индукции супероуляции, оплодотворяют сперматозоидами человека в условиях *in vitro*. После 24 ч культивирования оплодотворенные яйцеклетки фиксируют на предметных стеклах и окрашивают, что позволяет анализировать метафазу как ооцита, так и сперматозоида. Современное исследование сперматозоидов с помощью электронного микроскопа позволяет оценить морфологические изменения половых клеток, а анализ хромосом – выявить высокую частоту возникновения анеуплоидии в сперматозоидах (Zamboni, 1987; Shi and Martin, 2000).

Мейотические нарушения исследуют на биоптате яичек, однако необходимо учитывать, что извлеченный фрагмент может неадекватно отображать происходящие в нем патологические изменения. Непосредственный анализ сперматозоидов, полученных из эякулята, является одним из наиболее распространенных методов исследования. Разработка и внедрение молекулярно-цитогенетических методов с использованием различных ДНК зондов позволяют выявлять анеуплоидию и диплоидию в клетках, определять частоту хромосомных аномалий в сперматозоидах.

Ошибки мейоза в мужских гаметах исследуют следующим образом: анализируют непосредственно хромосомы на стадии метафазы I или II, изучают биваленты во время пахитены, анализируют структуры синаптономального комплекса. Применение двух-, трех- и многоцветовой FISH позволяет выявлять анеуплоидию хромосом в сперматозоидах мужчин с нарушением сперматогенеза с частотой 1-2%, структурные аномалии – 8% (Martin et al., 1991; Guttenbach et al. 1994; Pellestor et al. 1996a,б, 2002б;

Rubio et al., 2001; Chemes and Rawe, 2003). Среди выявленных случаев анеуплоидии преобладает нерасхождение половых хромосом. При структурных аномалиях точки разрыва в хромосомах сперматозоидов наблюдают преимущественно в светлых G-полосах (Martin, 1991; Estop et al., 1995a,б; Sermon, 2002).

Бесплодие у мужчин, носителей сбалансированной транслокации, возникает не только в связи с наличием гамет с несбалансированным кариотипом, но и в результате повышенной частоты анеуплоидии по другим хромосомам, не задействованным в транслокациях (Munne et al., 2000; Sermon, 2002).

Гаметы носителей Робертсоновских или реципрокных транслокаций имеют несбалансированный кариотип вследствие процесса сегрегации во время мейоза (Oliver-Bonet et al., 2001). Поскольку наличие несбалансированного кариотипа у зигот обуславливает раннюю гибель эмбриона, частоту возникновения различных продуктов сегрегации установить невозможно. Цитогенетический анализ сперматозоидов позволил исследовать процесс сегрегации сбалансированных транслокаций, а также выявить равную долю нормальных сперматозоидов и гамет с несбалансированным кариотипом (Estop et al., 1995a,б).

У мужчин с нарушением репродуктивной функции и нормальными показателями спермограммы повышенный риск анеуплоидии сперматозоидов не выявлен (Shi and Martin, 2001). В то же время, мужчины с нормальным кариотипом в лимфоцитах периферической крови и аномальными показателями спермограммы могут иметь хромосомные aberrации в сперматозоидах (Moosani et al., 1999; Rives et al., 2000; Huynh et al., 2002; Rubes et al., 2002; Sermon, 2002). С помощью цитогенетического и молекулярно-цитогенетического анализов установлено, что мужчины с аномальными показателями спермограммы имеют повышенный риск наличия сперматозоидов с анеуплоидией, в частности, по половым хромосомам (Pellestor et al., 1996a,б,в; Downie et al., 1997; Estop et al., 1998; Moosani et al., 1999; Chemes and Rawe, 2003).

Согласно показаниям спермограммы отмечают следующие закономерности: только определенные типы морфологически аномальных сперматозоидов ассоциируются с повышенной частотой анеуплоидии, существует обратная связь между частотой хромосомных аномалий и концентрацией сперматозоидов (олигозооспермия разной степени), четкая связь между частотой дисомии в сперматозоидах и их подвижностью отсутствует (Morel et al., 2000; Shi and Martin, 2001; Chemes and Rawe, 2003; Martin et al., 2003). Мужчины с олигозооспермией легкой степени (количество сперматозоидов $10-19 \cdot 10^6/\text{мл}$) имеют тот же процент хромосомных аномалий в сперматозоидах, что и индивиды в контрольной группе. Для мужчин с умеренной (количество сперматозоидов $1-9 \cdot 10^6/\text{мл}$) и тяжелой (количество сперматозоидов $<10^6/\text{мл}$) олигозооспермией характерна повышенная частота встречаемости хромосомных аномалий в половых клетках, среди которых преобладают численные аномалии гоносом. У мужчин с астенозооспермией выявлена более высокая частота сперматозоидов с дисомией хромосом 13 и X по сравнению с контрольной группой (Hristova et al., 2002). Эти данные необходимо принимать во внимание при использовании ВРТ. Согласно опыту работы Клиники проблем планирования семьи (Киев, Украина) технология ICSI позволяет осуществить отбор морфологически нормального сперматозоида, а дальнейшая ПГД – снизить риск возникновения анеуплоидии до минимума.

Современные микрохирургические технологии позволяют извлекать половые клетки из ткани яичка и его придатка при отсутствии сперматозоидов в эякуляте. Исследования хромосомного набора тестикулярных сперматозоидов свидетельствуют о повышенной частоте дисомии для хромосом 13, 21 и XY по сравнению с контрольной группой (Shi and Martin, 2001).

Еще в 70-80-х гг. XX ст. при изучении гистологических срезов яичек и придатков яичек у мужчин с бесплодием было выявлено прерывание процесса спермиогенеза (Chandley et al., 1976). Подобные находки позволили ученым предположить наличие ошибок во время мейотического деления, которые приводят к нарушению репродук-

тивной функции (Hulten et al., 1970; Pearson et al., 1970; Templado et al., 1976; Chaganti et al., 1980; Micic et al., 1982; Egozcue et al., 1983; Egozcue et al., 2000; Gonsalves et al., 2004; Tesarik, 2005). В конце 80-х–начале 90-х гг. была внедрена в практику ВРТ процедура пункции яичка и придатка яичка, позволяющая получать половые клетки и одновременно проводить детальные исследования мейотических нарушений.

Нормальный синапсис в мейотических клетках включает обмен (кроссинговер) между гомологичными хромосомами, тогда как при аутомсомной транслокации образуется асинаптический или гетеросинаптический комплексы между негомологичными хромосомами и, что более важно, с бивалентом половых хромосом. Взаимодействие между гетеросинаптическим квадрилвалентом аутомсом и XY-парой препятствует происходящей во время мейоза инактивации хромосомы X, транскрипция генов на хромосоме X прерывает мейотическое деление, приводя к нарушению сперматогенеза (Johannisson et al., 1993; Diemer and Desjardins, 1999). Нарушения синапсиса обуславливают полную (примерно в 18% случаев) или частичную остановку мейоза – нарушение процесса сперматогенеза – и проявляются у мужчин в виде азооспермии или тяжелой олигозооспермии (Hulten et al., 1970; Navarro et al., 1990; Egozcue et al., 2000).

Современное исследование поведения хромосом во время мейоза основывается на использовании иммунофлюоресцентного метода (Sun et al., 2004). У мужчин с аномалиями хромосом в сперматозоидах на стадии пахитены выявляют нарушения конъюгации гомологичных хромосом и, соответственно, образования синаптонеального комплекса, нарушения рекомбинации: у 10% мужчин с необструктивной азооспермией снижена степень участия хромосом в рекомбинации (Gonsalves et al., 2004; Sun et al., 2004). Как показали исследования на модельных системах, сниженный уровень образования хиазм во время рекомбинации связан с появлением хромосомных аномалий в гаметях (Koebler et al., 1996; Cooke and Saunders, 2002). У таких мужчин повышен риск продуцирования гамет с аномалиями хромосом, в ре-

зультате чего возможно рождение ребенка с хромосомной патологией (Hassold et al., 1991; Shi et al., 2001; Gonsalves et al., 2004).

В связи с выявлением аномалий поведения хромосом во время мейотического деления у мужчин с нарушением репродуктивной функции выделяют патологические состояния, связанные с ошибками мейоза (мейотические заболевания). У мужчин с нормальным кариотипом в лимфоцитах периферической крови возможны следующие нарушения мейоза на различных его стадиях: полное отсутствие процесса конъюгации гомологичных хромосом, отсутствие синапсиса между отдельными хромосомами или их участками, отсутствие образования полового пузырька на стадии пахитены, малое количество хиазм, незавершенный или отсутствующий десинапсис с наличием только унивалентов и фрагментацией бивалентов на стадии метафазы I с последующим блоком мейоза, аномальное количество хромосом на стадии метафазы II (Lange et al., 1997).

Таким образом, у многих мужчин с нормальным кариотипом и бесплодием возможны нарушения синапсиса во время мейоза, что приводит к появлению в большей степени диплоидных, нежели анеуплоидных гамет. Уровень эффективности применения программ ВРТ для таких мужчин снижен (Aran et al., 1999; Egozcue et al., 2000). Эмбрионы, полученные при оплодотворении дисомным сперматозоидом, анеуплоидны по половым хромосомам или аутомсомам, при этом эмбрионы с анеуплоидией по половым хромосомам более жизнеспособны. Вероятность рождения доношенного ребенка с кариотипом 47,XXY составляет 55,3%, с кариотипом 47,XXX – 70%, с кариотипом 47,XYY – 100% и кариотипом 45,X – 3% (Jacobs and Hassold, 1995; Egozcue et al., 2000). Преимплантационная генетическая диагностика позволяет проводить скрининг анеуплоидии, что имеет первостепенное значение в практике применения ВРТ.

Таким образом, рассмотренные хромосомные аномалии, встречающиеся у мужчин с нарушением репродуктивной функции, являются одним из наиболее распространенных этиологических факторов бес-

плодия. При использовании ВРТ следует учитывать результаты цитогенетического анализа обоих супругов, однако даже при наличии нормального кариотипа в лимфоцитах периферической крови у мужчин с нарушением репродуктивной функции существует повышенный риск возникновения хромосомных aberrаций в сперматозоидах (Aittomaki et al., 2005).

2.5. Структура хромосомы Y и клинические аспекты генетических изменений в длинном плече хромосомы Y

Возможности исследования причин бесплодия у мужчин в последнее десятилетие значительно расширились благодаря расшифровке генома человека, секвенированию хромосомы Y и внедрению современных молекулярных технологий в медицинскую практику, что позволило установить одну из причин нарушения репродуктивной функции у мужчин – микроделецию хромосомы Y (В.Б. Черных и др., 2001а,б; Cooke, 1999; Foresta et al., 2001а; Vogt, 2004). Исследования выявили неоднородную структуру хромосомы Y, установили ее роль в детерминации пола, дифференцировке мужской репродуктивной системы и сперматогенезе. Для того чтобы охарактеризовать известные на сегодня генетические аномалии хромосомы Y и их роль в возникновении бесплодия, необходимо детально рассмотреть строение хромосомы Y.

Хромосома Y составляет менее 1% генома и содержит около 60 млн п.н. (Cooke, 1999). Это единственная хромосома человека, которая всегда находится в гаплоидном состоянии. Морфологически хромосома Y отличается от всех других хромосом, ее размер варьирует между хромосомами групп E и G в зависимости от величины гетерохроматинового блока в q-плече, которая составляет от 1/2 до 2/3 длины q-плеча хромосомы Y: хромосома Y может быть меньше хромосом группы G и, наоборот, превышать размеры хромосом группы F, по длине достигая хромосом группы D.

Хромосома Y имеет короткое плечо (p-плечо) и длинное плечо (q-плечо). Короткое плечо (Yp11) и проксимальный участок длинного плеча (Yq11) содержат эухроматин, участок Yq11 делится на субрайоны Yq11.1, 11.21, 11.22, 11.23. Дистальный участок длинного плеча (Yq12) содержит гетерохроматин различного размера. Участок гетерохроматина визуализируют с помощью C-, Q-, DAPI-методов окрашивания, которые дали возможность проводить исследование полиморфизма хромосомы Y у мужчин.

Выделяют следующие районы хромосомы Y: псевдоаутосомные области в теломерных районах p- и q-плеча хромосомы Y, эухроматиновую область короткого плеча (Yp11),

эухроматиновую область проксимальной части длинного плеча (Yq11), гетерохроматиновую область дистальной части длинного плеча (Yq12), область перицентромерного гетерохроматина (рис. 2.11).

Попытки построения карты сцепления хромосомы Y были затруднены в связи с отсутствием мейотической рекомбинации по длине хромосомы. Первое картирование специалисты провели в 1986 г. с помощью Саузерн-блоттинга, используя ДНК мужчин, у которых цитогенетическим методом была выявлена делеция хромосомы Y. Хромосому Y условно разделили на семь делеционных интервалов (Vergnaud et al., 1986). В 1992 г. Д. Волрат, а затем П. Вогт, используя ПЦР и STS-технологии, разделили хромосому Y на 43 делеционных интервала (Vollrath et al., 1992; Vogt et al., 1996). Спустя десять лет в рамках проекта "Геном человека" хромосома Y была картирована, что позволило получить информацию о ее физической карте, строении генов и геномной организации, а также провести анализ делеций и механизмов их возникновения у мужчин с нарушением репродуктивной функции (Tilford et al., 2001; Skaletsky et al., 2003; Giachini et al., 2005). Рассмотрим детально районы хромосомы Y и гены, локализованные в них.

Псевдоаутосомные области (PAR) располагаются в теломерных районах p- и q-плеча хромосомы Y, составляя около 5% всей ДНК хромосомы Y. Благодаря гомологии районов PAR хромосомы Y с подобными участками хромосомы X происходят конъюгация и рекомбинация гоносом на стадиях зиготены и пахитены во время профазы первого мейотического деления. В псевдоаутосомных районах выявлены гены, которые наследуются как аутосомные гены.

Район PAR1 превосходит PAR2 по размеру, составляя 2,6 млн п.н. и содержит 11 генов, локализован на коротких плечах хромосом X и Y – Xp22.3/Yp11.3 (Gianfrancesco et al., 1998; Marshall Graves, 1998). Частота рекомбинации в этом районе значительно выше, чем в аутосомах. Делеции района PAR1 приводят к нарушению конъюгации хромосом X и Y во время мейоза и, соответственно,

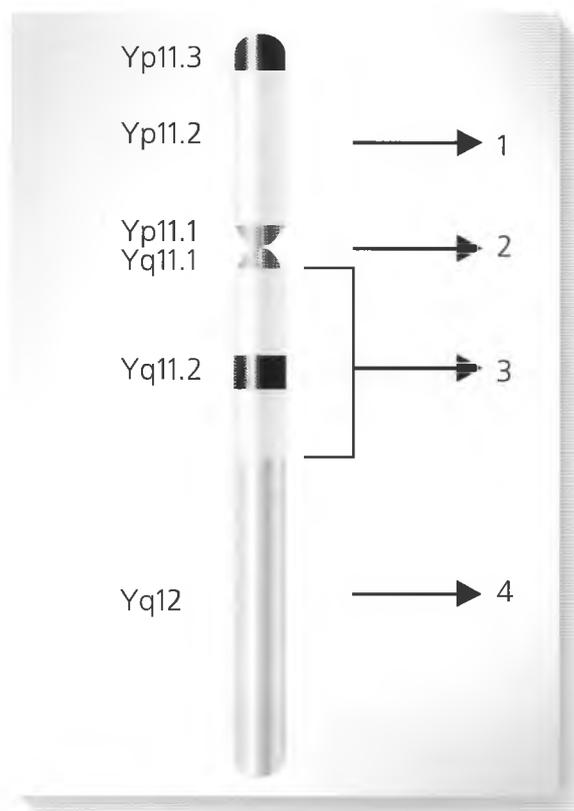


Рис. 2.11. Строение хромосомы Y. Идиограмма:

1 – эухроматин короткого плеча; 2 – перичентромерный гетерохроматин;
3 – эухроматин длинного плеча; 4 – гетерохроматин длинного плеча.

обуславливают бесплодие у мужчин (Mohandas et al., 1992). Район PAR2 является минорным, имеет протяженность всего 320 тыс п.н., расположен в дистальных участках длинных плеч хромосом X и Y – Xq28/Yq12, содержит два гена – *IL9R*, *SBY1*.

Мужской специфический район (MSY) включает эухроматиновую область, которая содержит X-транслоцированные, X-дегенеративные участки, сегментно-дублицированные области – апликоны. Этот участок не задействован в рекомбинации, его также называют нерекombинирующим участком (NRY). MSY содержит 78 генов, кодирующих 27 различных белков, из них 11 экспрессируются только в яичках (Affara et al., 1996; Skaletsky et al., 2003; Ali and Hasnain, 2003).

Конструирование физической карты хромосомы Y позволило установить, что ее нерекombинирующая часть богата повторяющимися последовательностями, собранными в апликоны различного размера. Установлен состав, количество копий и их ориентация, некоторые из них существуют в виде tandemных повторов, другие – инвертированных повторов, тогда как остальные разбросаны по длинному

плечу хромосомы Y (Tilford et al., 2001).

Большая часть (примерно 60%) длинного плеча хромосомы Y представляет собой функционально неактивный гетерохроматин, размер которого может варьировать. Гетерохроматиновая область длинного плеча хромосомы Y является генетически инертной и содержит различные типы повторов, в том числе альфоидные повторы (*Alu*-повторы, расположенные в центромерном районе), а также высокоповторяющиеся последовательности двух семейств *DYZ1* и *DYZ2*, каждое из которых составляет 3,4 и 2,1 тыс п.н. и представлено приблизительно в 800-4000 и 2000 копий, соответственно (Krausz and McElreavey, 1999; Ali and Hasnain, 2003).

В основе изменчивости гетерохроматиновых районов хромосом предположительно лежит главным образом неравный митотический кроссинговер (С.Г. Ворсанова и др., 2006, 2008). Приобретение в ходе эволюции хромосомой Y конститутивного гетерохроматина и его сохранение в геноме имеет большое биологическое значение, прежде всего, для обеспечения более надежного и эффектив-

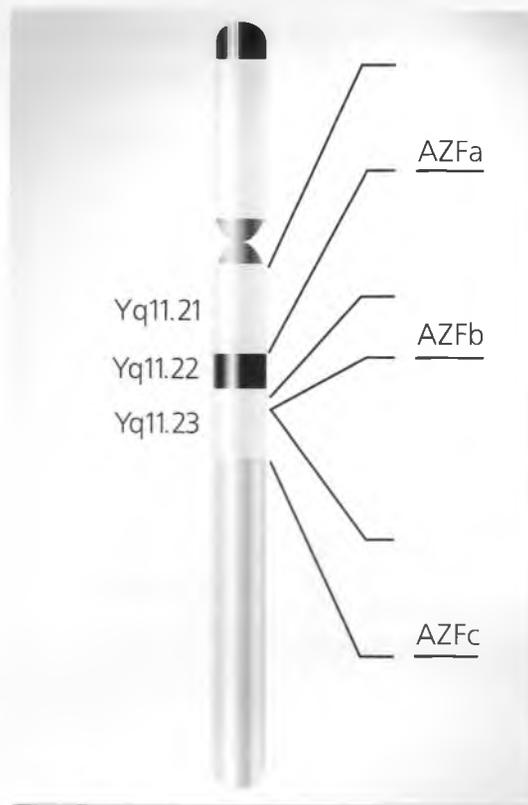


Рис. 2.12. Локализация субрегионов локуса AZF

ного функционирования всего генома. Наличие гетерохроматина обеспечивает надежную мейотическую изоляцию половых хромосом, поскольку гены, участвующие в половой дифференцировке по мужскому типу и обеспечивающие фертильность, локализованные на хромосоме Y, должны функционировать исключительно у лиц мужского пола и не участвовать в рекомбинации с генами хромосомы X. Кроме того, наличие гетерохроматина дает возможность компенсировать потерю в ходе эволюции уникального генетического материала хромосомы Y, сохранять некий ее минимальный размер и структуру, а также обеспечивать разделение и определенное пространственное расположение двух псевдоаутосомных областей хромосомы Y. Благодаря этому достигаются оптимальное взаимодействие с соответствующими районами хромосомы X, а также правильная мейотическая сегрегация хромосом X и Y за счет поздней репликации гетерохроматинового блока хромосомы Y в XY-клетках, аналогично поздней репликации инактивированной хромосомы X в XX-клетках.

Эухроматиновая область короткого плеча (Yp11) составляет 8 млн п.н. и содержит

несколько генов, в том числе **SRY** (sex-determining region Y) (MIM 480000). Белок, кодируемый этим геном, контролирует дифференцировку пола, отвечает за формирование яичек и процесс сперматогенеза. Делеция короткого плеча хромосомы Y или мутации в гене **SRY** нарушают детерминацию пола и, соответственно, приводят к нарушению развития половой системы. Ген **SRY** присутствует у мужчин с кариотипом 46,XX (синдром де ла Шапелля), а точечные мутации или делеции этого гена выявляют у 15% женщин с кариотипом 46,XY (синдром Сваера) (Harley et al., 2003). Патологические состояния, связанные с нарушениями детерминации пола, рассматриваются ниже.

В коротком плече хромосомы Y картированы гены **ZFY** (zinc finger protein, Y-linked) (MIM 490000) и **TSPY** (testis specific protein, Y-linked) (MIM 480100). Их роль в нарушении репродуктивной функции у мужчин в настоящее время исследуется.

Эухроматиновая область длинного плеча (Yq11) составляет 14,5 млн п.н., в ее проксимальной части картированы гены, входящие в состав **локуса AZF** (фактор азооспермии), разделенного на три непрерывающихся

Таблица 2.14. Гены хромосомы Y – кандидаты локуса AZF

Ген	Белок	Экспрессия в тканях	Локализация гена на хромосоме	Гомолог к хромосоме X	Гомолог к аутосомам	
BPY1 (AZFc) Альтернативное название VCY	Basic protein on Y chromosome (MIM 400012) Variably charged, Y chromosome (MIM 400012)	Неизвестен	Тестис-специфичная	Yq11.21- Yq11.221	VCX	—
BPY2 (AZFc)	Basic protein on Y chromosome (MIM 400013)	Неизвестен	Тестис-специфичная	Yq11.223	—	—
CDY (AZFc)	Chromodomain protein, Y chromosome (MIM 400016)	Chromatin package protein	Тестис-специфичная	Yq11.23	—	6p25.3-p24.3; CDYL
DAZ (AZFc)	Deleted in azoospermia (MIM 400003)	RNA-binding RRM proteins	Тестис-специфичная	Yq11.2	—	3p24; DAZL
DBY (AZFa)	DEAD/H box-3, Y-linked (MIM 400010)	RNA helicase	Различные ткани	Yq11	DBX	—
SMCY (AZFb) Альтернативное название HYA	Selected cDNA on Y, mouse, homolog of (MIM 426000) Histocompatibility Y antigen (MIM 426000)	H-Y antigen HLA B7	Различные ткани	Yq11.222	SMCX	—
EIF1AY (AZFb)	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked (MIM 400014)	Translation initiation factor	Различные ткани	Yq11.222- Yq11.223	EIF1AX	—
PRY (AZFc)	PTPBL-related gene on Y (MIM 400019)	Protein tyrosine phosphatase	Тестис-специфичная	Yq11.223	—	—
RBMY (AZFb, AZFc)	RNA-binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1 (MIM 400006)	RNA-binding RRM proteins	Тестис-специфичная	Yq11	RBMX	—
TSPY (AZFb)	Testis-specific protein, Y-linked (MIM 480100)	SET/NAP-1 regulated cell proliferation	Тестис-специфичная	pter-p11.2	—	6q22-q23; TSPL
TTY1 (AZFc)	Testis-specific transcript, Y-linked 1	—	Тестис-специфичная	Yq11.222; Yp11.2	—	—
TTY2 (AZFc)	Testis-specific transcript, Y-linked 2	—	Тестис-специфичная	Yq11.222; Yq11.2	—	—
UTY (AZFa)	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide gene on Y chromosome (MIM 400009)	H-Y антиген HYD	Различные ткани	Yq11	UTX	—
XKRY (AZFc)	XK-related protein on Y chromosome (MIM 400015)	Putative membrane transport protein	Тестис-специфичная	Yq11.222	—	—
USP9Y (AZFa) Альтернативное название DFFRY	Ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome (MIM 400005) Drosophila fat facets-related, Y-linked (MIM 400005)	Ubiquitin hydrolase H-Y antigen	Различные ткани	Yq11.2	USP9X DFFRX	—

(суб)региона – AZFa, AZFb, AZFc (рис. 2.12).

Каждый из этих участков содержит один или несколько генов-кандидатов, мутации в которых приводят к нарушению процесса сперматогенеза различной степени (табл. 2.14).

Субрегион AZFa занимает 800 тыс п.н., содержит три гена – *USP9Y*, *DBY*, *UTY* – и отличается от AZFb и AZFc по своей структуре: не содержит повторяющихся последовательностей, для него характерна низкая частота участия в делеции (Silber and Repping, 2002). Дальнейшее исследование этого региона имеет большое значение для понимания генетической основы нарушения репродуктивной функции у мужчин.

Первым геном, идентифицированным в AZFa у здоровых мужчин и отсутствовавшим у обследованных бесплодных мужчин, был ген *USP9Y*, первоначально получивший название *DFFRY* (*Drosophila fat facets related*, Y-linked) и названный так вследствие его гомологии с геном *Faf* у дрозофилы (Foresta et al., 2001b; Huynh et al., 2002). Позже этот ген был переименован – *USP9Y* (ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome) (MIM 400005) и картирован в участке q11.2 хромосомы Y и участке p11.4 хромосомы X. Гены *USP9Y* и *DBY* (dead box/H box3, Y-linked) (MIM 400010) представлены в единичной копии. Делеция гена *UTY* (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y chromosome) (MIM 400009) не отражается на мужской репродуктивной функции, тогда как отсутствие одного из генов *USP9Y* или *DBY* влечет тяжелое нарушение процесса сперматогенеза, особенно в случае мутации или делеции обоих генов. У таких мужчин наблюдают азооспермию с синдромом "только клетки Сертоли" (Blanco et al., 2000; Foresta et al., 2001b).

В большинстве случаев при нарушениях процесса сперматогенеза описаны микроделеции гена *USP9Y*, однако встречаются отдельные сообщения о возникших *de novo* точковых мутациях в этом гене, которые приводят к тяжелому гипосперматогенезу (Blanco et al., 2000; Foresta et al., 2001b). Делеция гена *DBY* происходит чаще, чем *USP9Y*, и обуславливает синд-

ром "только клетки Сертоли", тяжелый гипосперматогенез (Foresta et al., 2001b).

Субрегион AZFb занимает 4,3 тыс п.н., локализован в делеционном интервале 5M-6B хромосомы Y, проксимальная часть AZFb состоит из прямых и инвертированных высокоповторяющихся последовательностей, собранных в палиндромы, однако большая часть региона содержит последовательности, представленные в единичной копии. В субрегионе картированы два гена: *E1F1AY* (eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked) (MIM 400014), имеющий гомолога на хромосоме X, и *RBMY* (RNA-binding motif protein, Y chromosome, family, member A1) (MIM 400006) (Ferlin et al., 2003a). *RBMY* относится к семейству многокопийных генов (30-40 копий), некоторые из которых являются псевдогенами. Гены и псевдогены семейства *RBMY* подразделяют на несколько подсемейств (*RBMY1* до *RBMY6*). Первыми в 1993 г. были идентифицированы гены *RBMY1* и *RBMY2* (Ma et al., 1993; Fox and Reijo Pera, 2001). Все функционально активные копии гена *RBMY* расположены в субрегионе AZFb (Chai et al., 1997; Elliott et al., 1997; Silber and Repping, 2002). Генам семейства *RBMY* свойственна тестис-специфичная экспрессия (Foresta et al., 2001a).

Делеции копии или копий гена *RBMY* в AZFb выявляют у мужчин с азооспермией или тяжелой олигозооспермией, что позволяет сделать вывод о связи этой делеции с нарушением сперматогенеза во время мейоза.

Субрегион AZFc является наиболее изученным из всех участков локуса AZF и задействован в делеции чаще по сравнению с другими регионами (Fernandes et al., 2004). Около 12% мужчин с азооспермией и 6% мужчин с тяжелой формой олигозооспермии имеют делецию этого региона (Silber et al., 1998; Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Silber and Repping, 2002). Протяженность AZFc составляет $3,5 \cdot 10^6$ п.н., субрегион содержит восемь семейств генов размером от 115 до 678 тыс п.н., которые экспрессируются только в яичках: три белок-синтезирующих семейства генов (*DAZ*, *BPY2*, *CDY1*), два транскрипционных семейства *CSPG4LYP2* (chondroitin sulfate proteoglycan 4-like, Y-linked pseudogene 2),

GOLGA2LY (golgi autoantigen, golgin subfamily A, 2-like, Y-linked) (MIM 400035) и два некодирующих семейства **TTY3** (testis-specific transcript, Y-linked 3) и **TTY4** (testis-specific transcript, Y-linked 4). AZFc состоит в основном из больших блоков высокоповторяющихся последовательностей, которые называются апликонами и организованы в палиндромные структуры, обладающие высокой идентичностью последовательностей (>99,9%) (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Эти структуры часто подвергаются инверсиям, дупликациям и делециям (Repping et al., 2003; Skaletsky et al., 2003; Fernandes et al., 2004). Палиндромный комплекс содержит 11 семейств транскрипционных единиц, экспрессирующихся в яичках. Одним из них является семейство генов **DAZ** (deleted in azoospermia) (MIM 400003), которое было идентифицировано в числе первых генов хромосомы Y, ответственных за сперматогенез, и является наиболее детально изученным (Reijo et al., 1995; Saxena et al., 1996; Simoni et al., 1997; Silber and Repping, 2002; Ferlin et al., 2005). Изучение экспрессии генов семейства **DAZ** показало наличие мРНК этих генов в незрелых половых клетках (сперматогониях и сперматоцитах) (Reijo et al., 1996; Menke et al., 1997; Ruggiu et al., 1997; Silber and Repping, 2002). Установлен гомолог **DAZ**, который назван **DAZL** (deleted in azoospermia-like) (MIM 601486) и картирован на хромосоме 3p24 (Yen et al., 1996; Ma et al., 2000).

Помимо семейства генов **DAZ**, в субрегионе AZFc выявлены также гены семейства **CDY**, **BPY2**, **PRY**, **TTY2** (Lahn and Page, 1997; Yen et al., 1997; Huynh et al., 2002). Все они являются Y-специфичными генами, экспрессируются только в яичках. Семейство **CDY** состоит из трех генов: **CDY1** мажорный, **CDY1** минорный (chromodomain protein, Y chromosome, 1) (MIM 400016) и **CDY2** (chromodomain protein, Y chromosome, 2) (MIM 400018). Гомолог **CDY** расположен в дистальном конце короткого плеча хромосомы 6 (6p25.3-6p24.3).

Известны четыре функциональные копии гена **PRY**, две из них, **PRY1** (PTPN13-like, Y-linked) (MIM 400019) и **PRY2** (PTPN13-like, Y-linked 2) (MIM 400041), экспресси-

руются только в яичках (Stouffs et al., 2001).

В непосредственной близости от локуса AZF расположен ген **UTY** (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y chromosome) (MIM 400009), кодирующий специфический для мужского пола мембранный клеточный белок – H-Y антиген.

Тестис-специфичные гены представлены в различных копиях – от одной (**TGIF2LY**), до двух (**VCK**, **XKRY**, **HSFY**, **PRY**), трех (**BPY2**), четырех (**CDY**, **DAZ**), шести (**RBM1**) и даже до 35 копий (**TSPY**) (Lahn and Page, 1999; Lau, 1999; Skaletsky et al., 2003).

Идентифицированные гены хромосомы Y были классифицированы на основе их локализации на хромосоме, специфичности и выполняемых функций (Foresta et al., 2001b).

Согласно локализации выделяют следующие группы генов.

- Псевдоаутосомные гены (**ASMTL**, **MIC2**, **IL9R**); их последовательности идентичны в хромосомах X и Y, за некоторыми исключениями они экспрессируются в различных тканях.

- Гены нерекombинирующего района хромосомы Y – **NRY** (**USP9Y**, **DBY**, **UTY**), которые имеют гомолога на хромосоме X, кодируют белки с очень высокой идентичностью.

- Y-специфичные семейства генов (**DAZ**, **CDY**, **TSPY**); представляют собой многокопийные гены, дисперсно расположенные по длине хромосомы или собранные в кластеры, экспрессируются только в тканях яичек (тестис-специфичные).

Ген **SRY** – исключение в этой классификации, является Y-специфичным, представлен в единственной копии и имеет различные паттерны экспрессии: во время эмбрионального развития экспрессируется в половых валиках, а во время внутриутробного развития и после рождения – в клетках Сертоли и сперматозоидах.

В основу другой классификации генов хромосомы Y легла их специфичность, согласно которой гены делят на Y-специфичные многокопийные гены (**CDY**, **DAZ**, **PRY**, **RBM**, **TSPY**, **TTY1**, **TTY2**) и X-Y гомологичные гены (**DBY**, **DFFRY**, **EIF1AY**, **SMCY**,

UTY) (Lahn and Page, 1997; Blagosklonova et al., 2000).

Согласно функционированию гены хромосомы Y подразделяют на следующие группы:

- контролирующий дифференцировку пола, отвечающий за формирование яичек и процесс сперматогенеза (*SRY*);
- вовлеченные в процесс сперматогенеза (*DAZ*, *RBMY*, *CDY*);
- выполняющие функцию "домашнего хозяйства" (cellular housekeeping functions) (*RPS4Y*, *EIF1AY*);
- связанные с такими патологическими состояниями, как гонадобластома и синдром Шерешевского–Тернера (*TSPY*, *UTY*).

Длинное плечо хромосомы Y содержит 15 семейств генов, которые вовлечены в контроль над сперматогенезом, а также ответственны за развитие и дифференцировку половых клеток (Krausz and McElreavey, 2001; Feng, 2003). Среди них особую роль играют гены, локализованные в эухроматиновом районе длинного плеча хромосомы Y, – в локусе AZF-фактора. В последние годы были детально изучены три неперекрывающихся участка в локусе AZF (AZFa, AZFb, AZFc) хромосомы Y, выявлены и описаны делеции в этих районах, обуславливающие возникновение мужского бесплодия.

Под термином "микроделеции хромосомы Y" следует понимать не четко поставленный генетический диагноз на молекулярном уровне, а отсутствие локуса AZF или его субрегионов (AZFa, AZFb, AZFc), что обуславливает нарушение сперматогенеза различной степени в зависимости от размера и локализации делеции. Более того, микроделеции необходимо дифференцировать от делеции или мутации определенного гена (В.Б. Черных и др., 2006; Foresta et al., 2001a; Vogt, 2004).

Микроделеции хромосомы Y по частоте встречаемости стоят на втором месте после хромосомной патологии среди факторов, лежащих в основе нарушения репродуктивной функции у мужчин. Первые сообщения о делеции длинного плеча хромосомы Y у мужчин с нарушениями сперматогенеза датированы 1971 г., а в 1976 г. Л. Тиэполо и О. Зуффарди проана-

лизировали накопленные наблюдения (Chandley and Edmond, 1971; Tiepolo and Zuffardi, 1976). При проведении цитогенетического анализа у шести пациентов с бесплодием и азооспермией ученые выявили делецию гетерохроматинового участка длинного плеча хромосомы Y, в четырех случаях делеции возникли *de novo*, морфология хромосомы Y у отцов и братьев обследуемых была нормальной. Дифференциальный метод окрашивания (Q-метод) показал у этих мужчин отсутствие всего светящегося гетерохроматинового блока и части нефлюоресцирующего сегмента, лежащего проксимальнее локуса Yq11. У всех пациентов отсутствие сперматозоидов в эякуляте было единственным симптомом, что дало возможность исследователям выдвинуть предположение о локализации генов, отвечающих за сперматогенез, в этом дистальном участке хромосомы Y (Yq11.23). Л. Тиэполо и О. Зуффарди предложили гипотезу о существовании на хромосоме Y фактора, расположенного в участке, граничащем с гетерохроматиновым блоком, который содержит ген или группу генов и отвечает за сперматогенез. Этот фактор был позже назван фактором азооспермии (Andersson et al., 1988; Kleiman et al., 1999). На протяжении последующих 20 лет продолжался интенсивный поиск генов, контролирующих сперматогенез, проводились молекулярные исследования локуса AZF, как у фертильных мужчин, так и у пациентов с нарушением репродуктивной функции. Локус, содержащий фактор азооспермии, был картирован в 1988 г. в сегменте Yq11.22-23 (Andersson et al., 1988; Chandley and Cooke, 1994). Дальнейшие молекулярные исследования с использованием зондов из интервала b хромосомы Y позволили подтвердить наличие делеции у нескольких мужчин с азооспермией (Johnson et al., 1989). В середине 90-х гг. с помощью метода ПЦР и конструированной STS-карты хромосомы Y было показано, что длинное плечо хромосомы Y содержит не один, а несколько отдельных интервалов – AZFa, AZFb, AZFc, в которых может происходить делеция (Qureshi et al., 1996; Vogt et al., 1996; Liow et al., 1998; Kent-First et al., 1999). В эти же годы с помощью молекулярных ме-

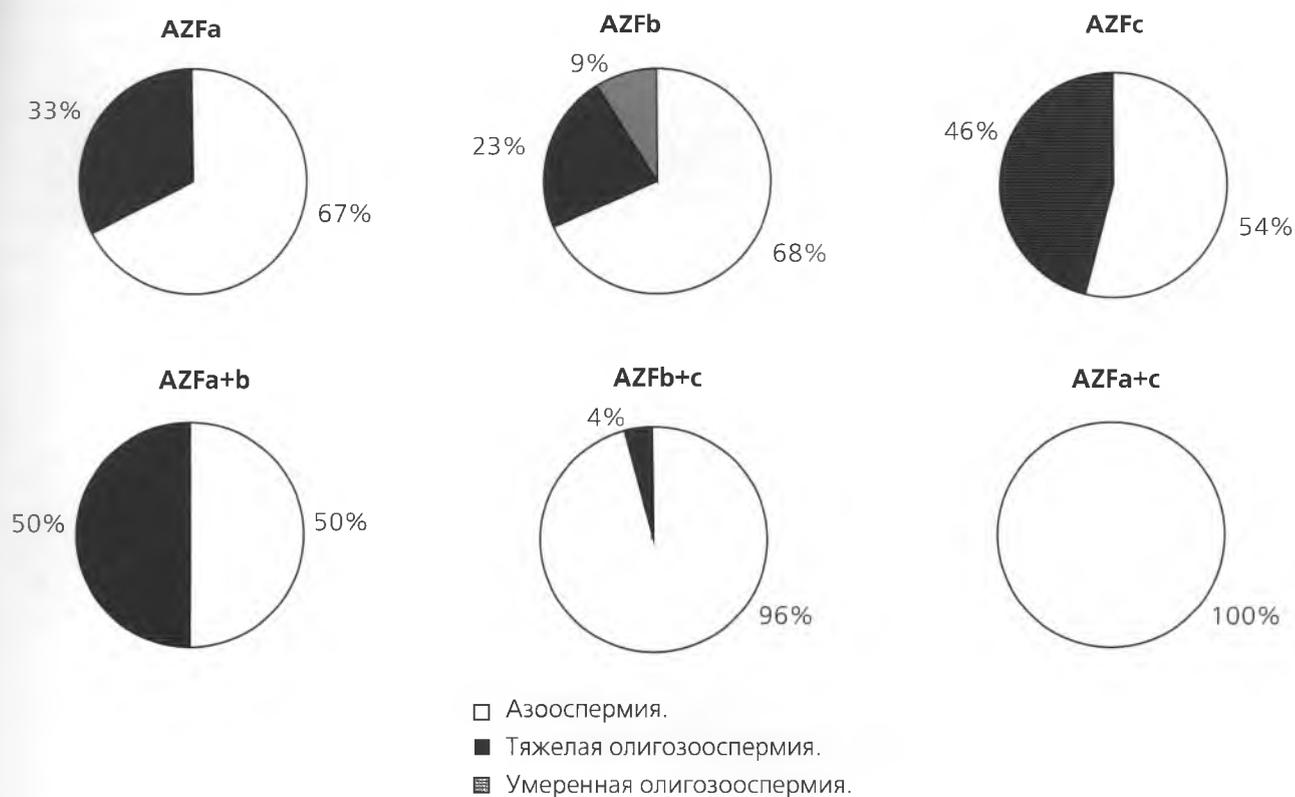


Рис. 2.13. Соотношение патологических показателей спермограммы при микроделециях разных участков локуса AZF хромосомы Y (цит. по Foresta et al., 2001в)

тодов было выявлено, что более чем 0,5% мужчин с азооспермией имеют генетические дефекты хромосомы Y. Позже ученые установили, что мужчины с олигозооспермией тяжелой формы, а также синдромом "только клетки Сертоли" могут иметь микроделеции хромосомы Y (Л.А. Лівшиць і О.А. Ясінська, 2002; Ma et al., 1992, 1993, 2000; Bhasin et al., 1994; Kremer et al., 1997, 1998; Pryor et al., 1997; Liow et al., 1998; Oliva et al., 1998; Krausz et al., 1999a,б; Cram et al., 2000; Krausz and McElreavey, 2001; Silber and Repping, 2002). Таким образом, частота встречаемости микроделеций хромосомы Y у мужчин с идиопатической азооспермией составляет 10-15%, у мужчин с тяжелой олигозооспермией – 5-10% (Reijo et al., 1996a; Bonhoff et al., 1997; Edwards and Bishop, 1997; Girardi et al., 1997; Stuppia et al., 1998; Foresta et al., 1999; Krausz and McElreavey, 1999; Kurilo et al., 1999; Mark, 2000; Quintana-Murci et al., 2001; Silber and Repping, 2002; Ali and Hasnain, 2003; Foresta et al., 2005). Предположительно 1 из 6000 мужчин является носителем микро-

делеции хромосомы Y. В последние годы появилась возможность оценки частоты возникновения микроделеций различных участков локуса AZF у мужчин с нарушением репродуктивной функции, спермиологический анализ которых демонстрирует разной степени олигозооспермию и азооспермию (рис. 2.13).

Микроделеции субрегиона AZFc встречаются с частотой 1/4000 бесплодных мужчин, а AZFa – 1/100 000 (Affara, 2001; Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Katz et al., 2002; King et al., 2005).

Распределение частоты встречаемости того или иного типа микроделеций следующее: 60% составляют микроделеции субрегиона AZFc, 16% – AZFb и 5% – AZFa. Микроделеции, захватывающие более одного интервала (два или три), диагностируют в 14% случаев, остальные 5% составляют случаи микроделеций, не захватывающих ни один из субрегионов AZFa, AZFb или AZFc.

Помимо микроделеций локуса AZF, в неко-

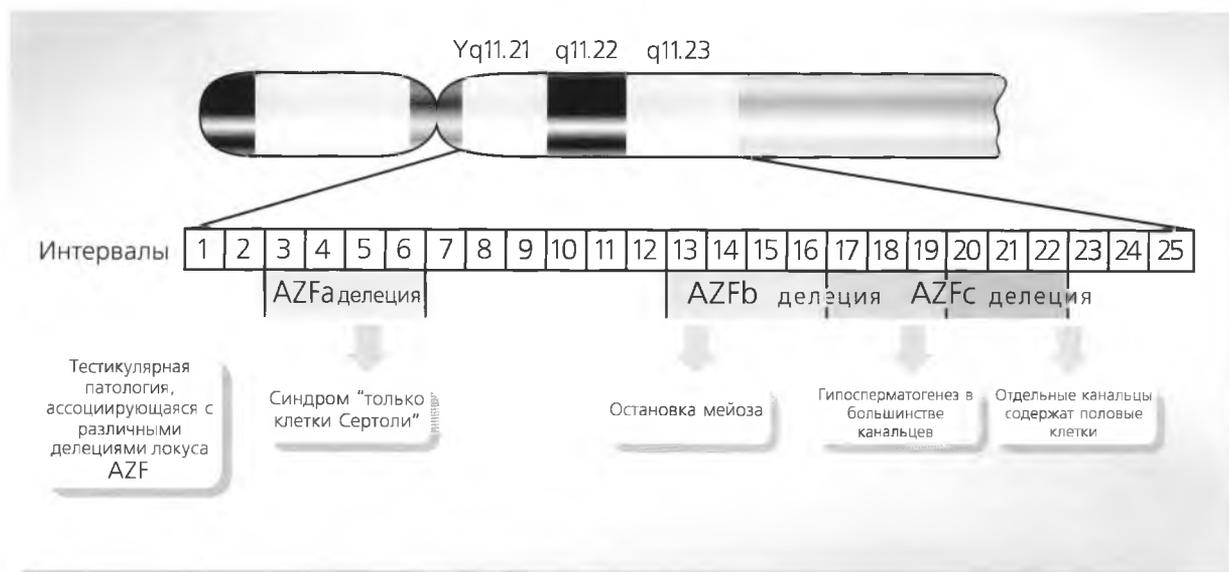


Рис. 2.14. Карта трех субрегионов AZF хромосомы Y. Варианты микроделеций и нарушений сперматогенеза, обусловленных этими мутациями

торых случаях азооспермия или олигозооспермия может быть обусловлена точечной мутацией в гене *USP9Y* субрегиона AZFa (Sun et al., 2000). Таким образом, участие длинного плеча хромосомы Y в регуляции сперматогенеза и возникновении идиопатического бесплодия доказано.

Нарушения сперматогенеза у мужчин с микроделецией хромосомы Y могут варьировать от тяжелого гипосперматогенеза до наличия синдрома "только клетки Сертоли" и блокирования процесса сперматогенеза (Foresta et al., 1998a) (рис. 2.14).

Микроделеции выявляют как у мужчин с азооспермией, гипоплазией яичек и высокой концентрацией гормона ФСГ в плазме крови, так и у мужчин с олигозооспермией, нормальным и незначительно повышенным уровнем ФСГ (Foresta et al., 2001a). В литературе описаны случаи наличия микроделеции у некоторых мужчин с крипторхизмом и варикоцеле (Foresta et al., 1999; Fauser, 2003).

Скрининг микроделеций хромосомы Y проводится во многих лабораториях мира и является стандартной процедурой для мужчин с тяжелой олигозооспермией и азооспермией, обратившихся за медицин-

ской помощью в связи с бесплодием (Simoni et al., 1998; Kamischke et al., 1999; Simoni, 2001).

Делеции AZFa встречаются редко, у мужчин с таким типом делеции наблюдают полное отсутствие сперматогониев (синдром "только клетки Сертоли"). В случаях делеции всего субрегиона AZFa с расположенными в нем генами *DBY* и *USP9Y* у мужчин наблюдают тяжелое нарушение процесса сперматогенеза и азооспермию (Foresta et al., 2000; Silber and Repping, 2002). Если в мутации задействован только один из двух генов, как, например, у мужчины с точечной мутацией в гене *USP9Y*, нарушения сперматогенеза не столь тяжелые, в отдельных семенных канальцах возможно присутствие сперматозидов на стадии пахитены, которые превращаются в зрелые сперматозоиды, у мужчин наблюдается необструктивная азооспермия (Silber and Repping, 2002).

Делеции субрегиона AZFb выявляют чаще, чем AZFa, но они не настолько распространены, как делеции AZFc. Все описанные случаи делеции AZFb выявлены у мужчин с азооспермией и полным отсутствием сперматозоидов в яичках в связи с за-

держкой созревания сперматозоидов в ходе сперматогенеза (Vogt, 1997; Vogt et al., 1992, 1995, 1996; Brandell et al., 1998; Kim et al., 1999b; Martinez et al., 2000; Silber and Repping, 2002; Ferlin et al., 2003a). Прогноз исхода процедуры TESA для мужчин с таким типом делеции неблагоприятный.

Для мужчин с делецией AZFc характерен широкий спектр нарушений репродуктивной функции – от олигозооспермии до азооспермии. Большинство этих мутаций возникают *de novo* в результате крупной делеции (>1млн п.н.), делетируются тестис-специфичные гены указанного участка – *BPY2*, *CDY1*, *DAZ*, *PRY*, *RBMV*, *TTY2* (Yen, 1998; Saut et al., 2000; Silber and Repping, 2002). Описаны как делеции всего локуса, так и его частей. Некоторые из делеций меньшего размера были обнаружены у мужчин с олигозооспермией средней тяжести, что свидетельствует о возможном эффекте "дозы генов": у мужчин с делецией двух копий генов семейства *DAZ* наблюдается более низкая частота возникновения нарушений сперматогенеза, чем у мужчин с отсутствием всех четырех копий (De Vries et al., 2002; Silber and Repping, 2002; Vogt and Fernandes, 2003).

В последние годы детально исследована природа повторяющихся последовательностей субрегиона AZFc – апиконов, гомологичная рекомбинация между которыми может обуславливать делеции и дупликации в этом локусе, которые выявляют примерно у 12% мужчин с азооспермией и 6% – с тяжелой олигозооспермией (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Fernandes et al., 2004; De Llanos et al., 2005).

Благодаря исследованию субрегиона AZFc с помощью локус-специфичной ПЦР-оценки и двухцветовой FISH был выявлен и описан общий класс частичной делеции этого локуса, названный *gr/gr* делециями. Полагают, что *gr/gr* делеции являются следствием потери нескольких, но не всех копий генов региона AZFc. Этот тип делеции обнаружен у 2,2% мужчин с бесплодием и 3,8% мужчин с количеством сперматозоидов в эякуляте <5·10⁶/мл (Machev et al., 2004; De Llanos et al., 2005). Полученные данные позволяют предположить, что

наличие *gr/gr* делеции может быть фактором риска для мужчин с нарушением репродуктивной функции (Teng et al., 2002; Giachini et al., 2005).

Делецию одного из субрегионов AZFa, AZFb или AZFc принято считать потенциальным прогностическим фактором при поиске сперматозоидов у мужчин, у которых в рамках программы ЭКО с ICSI сперматозоиды получают одним из микрохирургических методов (TESA, PESA, TESE, MESA) (Krausz et al., 2000; Feng, 2003). У мужчин с бесплодием и проксимальной делецией, включающей AZFa и AZFb, наблюдают тяжелые нарушения сперматогенеза с высокой частотой возникновения синдрома "только клетки Сертоли", тогда как у мужчин с делецией дистального участка субрегионов AZFb и AZFc нарушение сперматогенеза может быть менее тяжелым. Делеции участков, включающих не только регион AZFc, например, AZFb+c или AZFa+b+c, могут приводить к полному отсутствию сперматозоидов в яичках. У мужчин с делецией только AZFb в яичках присутствуют сперматоциты, что имеет прогностическую ценность для проведения процедуры TESE. У мужчин с делецией AZFc нарушение сперматогенеза происходит на стадии образования сперматид – зрелые сперматозоиды доступны для процедуры ICSI (Page et al., 1999; Feng, 2003).

Следует учесть тот факт, что сперматозоиды мужчин с микроделецией хромосомы Y чаще имеют аномальный набор хромосом, в том числе нуллисомию или XY-дисомию (Foresta et al., 2005).

Согласно рекомендациям ESHRE при проведении диагностики микроделеций хромосомы Y кандидатами для анализа являются мужчины, концентрация сперматозоидов в эякуляте которых составляет <5·10⁶/мл (Van Landuyt et al., 2000; Simoni, 2001; Aknin-Seifer et al., 2003). Для проведения молекулярного анализа используют амплифицированные STS в двух мультиплексных ПЦР: sY84 и sY86 (для субрегиона AZFa), sY127 и sY134 (для субрегиона AZFb), sY254 и sY255 (для субрегиона AZFc), а также SRY и ZFY в качестве контроля.

Наиболее информативными маркерами