

Н.В. Зотова, Е.В. Маркова, И.Ю. Тимофеева, О.М. Казанцева,
Н.В. Казьмина, А.В. Светлаков

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТОЧЕК РАЗРЫВОВ ПРИ СТРУКТУРНЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ У МУЖЧИН С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

УДК 575.224.23; 612.663.5

В работе представлены результаты молекулярно-цитогенетических исследований хромосомных перестроек у пяти мужчин с нарушением репродуктивной функции, обратившихся в Центр репродуктивной медицины г. Красноярск. С использованием метода SKY в четырех случаях и метода FISH в трех случаях удалось локализовать точки разрывов на хромосомах и установить у трех пациентов несбалансированные, а у двух – сбалансированные транслокации.

Ключевые слова: спектральное кариотипирование, FISH, транслокации, нарушение репродуктивной функции.

In this study we introduce the results of molecular-cytogenetic study of five men with chromosome rearrangements and reproductive failure. They are patients of the Center for Reproductive Medicine in Krasnoyarsk. Using SKY technique in four cases and FISH method in three cases we localized chromosome breakpoints and found unbalanced translocations in three patients and balanced translocations in two patients.

Keywords: spectral karyotyping, FISH, translocations, reproductive failure.

Сбалансированные транслокации возникают при обмене терминальными сегментами между негомологичными хромосомами. Частота их возникновения составляет 1 на 625 новорожденных [1]. В основном реципрокные транслокации фенотипически нейтральны, поскольку существует сбалансированный комплект генов. Аномалии возникают в том случае, когда точки разрыва повреждают важные гены. Во время сегрегации герминальные линии со сбалансированными реципрокными транслокациями могут продуцировать различные типы гамет, из которых только два варианта позволяют родиться ребенку без хромосомных аномалий [3, 9].

Структурные хромосомные перестройки обнаруживаются в 10 раз чаще по сравнению с общепопуляционными показателями среди мужчин с различной степенью тяжести нарушения сперматогенеза и пар со спонтанными абортными и аномалиями у потомства [8, 12, 5]. Частота репродуктивных потерь коррелирует с высокой продукцией несбалансированных гамет и может отражать различные типы несбалансированных кариотипов эмбрионов и плодов. Однако до сих пор не ясно, почему некоторые носители сбалансированных хромосомных перестроек бесплодны. Различное влияние хромосомных перестроек на фертильность могут об-

ясняться воздействием на инактивацию X-хромосомы; контактированием с аутосомами; относительной важностью генов, вовлеченных в перестройку; и общим генетическим фоном [12].

Для многих транслокаций идентификация хромосомной перестройки не вызывает затруднений с использованием стандартного кариотипирования. Однако в ряде случаев детекция сбалансированного либо несбалансированного хромосомного набора, а также маркерных хромосом может быть затруднительной в связи с малыми размерами перестроенных фрагментов, неясным происхождением дополнительного хромосомного фрагмента. Особенно актуальна задача выявления несбалансированных вариантов кариотипа при проведении пренатальной или преимплантационной генетической диагностики (ПГД).

Молекулярно-цитогенетический подход с использованием FISH-метода позволяет охарактеризовать сложную перестройку, точно идентифицировать точки разрывов на транслоцированных хромосомах и планировать проведение инвазивной дородовой диагностики. Такая диагностика позволяет выявить несбалансированный кариотип даже при получении единичных клеток.

Материалы и методы исследования

В работе представлено молекулярно-цитогенетическое исследование кариотипов пяти пациентов мужского пола Центра репродуктивной медицины г. Красноярск, обратившихся по вопросу нарушения репродуктивной функции.

Хромосомный анализ проводили на препаратах метафазных хромосом, полученных после культивирования ФГА-стимулированных лимфоцитов в течение 72 часов. Для дифференциального окрашивания использовался GTG-метод. Анализировали 11-13 метафазных пластинок [2]. Для получения изображения метафаз и анализа кариотипов использовали программный продукт «Band View» (Applied Spectral Imaging, USA).

Характеристика обследованных пациентов с выявленными сложными случаями структурных хромосомных перестроек в кариотипе по результатам стандартного цитогенетического обследования представлены в таблице.

SKY-анализ проводили с использованием набора «SkyPaint Kit» (Applied Spectral Imaging, USA). Гибридизацию осуществляли в течение 24 часов. Гибридизация и постгибридизационная отмывка проводились по протоколу,

Характеристика обследованных пациентов

Случай	Возраст, лет	Показания к обследованию	Спермограмма	Кариотип
Пациент 1	39	Первичное бесплодие	Тяжелая олигозооспермия	46,Xdel(Yq),add(5)(qter)
Пациент 2	28	Планирование беременности	—	46,XY,add(15)(pter)
Пациент 3	40	Первичное бесплодие	Олигоастенозооспермия	47,XY+mar
Пациент 4	36	Спонтанное прерывание беременности в семье пробанда	Астенотератозооспермия	46,XY,der(6)t(6;7)(q25;q32)
Пациент 5	39	Первичное бесплодие	Олигоастенозооспермия	46,XY,der(14)t(9;14)

Сотрудники Красноярского Центра репродуктивной медицины, e-mail: krasivf@kcrn.ru: **ЗОТОВА Надежда Викторовна** – биолог-генетик, e-mail: nadyazotova@mail.ru; **МАРКОВА Елена Викторовна** – к.б.н., зам. директора по науке; **ТИМОФЕЕВА Ирина Юрьевна** – биолог-генетик; **КАЗАНЦЕВА Ольга Михайловна** – врач-генетик; **КАЗЬМИНА Неля Васильевна** – биолог-генетик; **СВЕТЛАКОВ Анатолий Васильевич** – к.б.н., директор Центра.

предложенному фирмой-производителем ДНК-зондов. Анализировали 11 метафазных пластинок. Для получения изображения метафаз и анализа кариограмм использовали флуоресцентный микроскоп «Olympus BX-51» (Olympus, Japan) с набором светофильтров (Applied Spectral Imaging, USA), интерферометр «LBLS-609» (Sutter Instrument Company, USA) и программный продукт «Sky View» (Applied Spectral Imaging, USA).

Для мультицветного FISH-анализа использовали специфичные ДНК-зонды на хромосомы: Y (DYZ1, DYZ3) – Spectrum Orange, CEP 15 – Spectrum Aqua, tel 15q – Spectrum Orange, tel 14q – Spectrum Orange и набор зондов «MultiVysion PGT» на хромосомы 13, 18, 21, X и Y (Abbott Molecular Inc.) Гибридизацию осуществляли в течение 6 часов. Гибридизация и постгибридизационная отмывка выполнялись согласно инструкциям к наборам «Abbott Molecular Inc.». Для получения изображения клеток и анализа использовали программный продукт «FISH View» (Applied Spectral Imaging, USA).

Результаты и обсуждение

Для всех обследованных лиц использованы дополнительные методы молекулярно-цитогенетического обследования FISH и SKY для идентификации точек разрывов на хромосомах.

Случай 1 и 2

При стандартном кариотипировании пациента 1 был установлен кариотип: 46,Xdel(Yq),add(5)(qter) (рис.1,а). Метод SKY помог установить несбалансированную транслокацию 46,XY,der(5)t(Y;5)(q12;q35) (рис.1,б).

При цитогенетическом исследовании пациента 2 обнаружен несбалансированный кариотип с дополнительным материалом на коротком плече хромосомы 15: 46,XY,add(15)(pter) (рис.2,а). С использованием SKY-анализа выявлен кариотип пациента: 46,X,Y,der(15)t(Y;15)(q12;p12) (рис.2,б).

Для локализации точек разрыва на Y-хромосоме при транслокации для случаев 1 и 2 проведен FISH-анализ с ДНК-зондами на Y-хромосому. Использовали ДНК-зонды CEP Y (DYZ3) и CEP Y (DYZ1). При FISH-исследовании с α-сателлитным зондом DYZ3 (Yp11.1-q11.1) в обоих случаях выявлено наличие только одного сигнала на клетку, что свидетельствовало о локализации данного региона полностью на Y-хромосоме. В случае проведения FISH с ДНК-зондом на DYZ1-регион Y-хромосомы выявлено расщепление

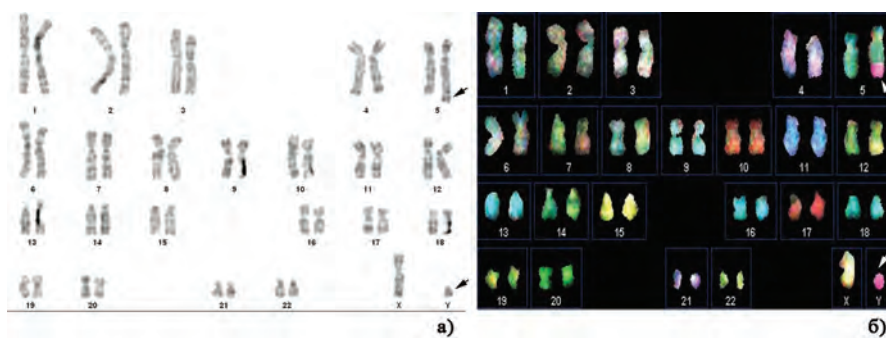


Рис.1. Раскладка хромосом пациента 1: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование

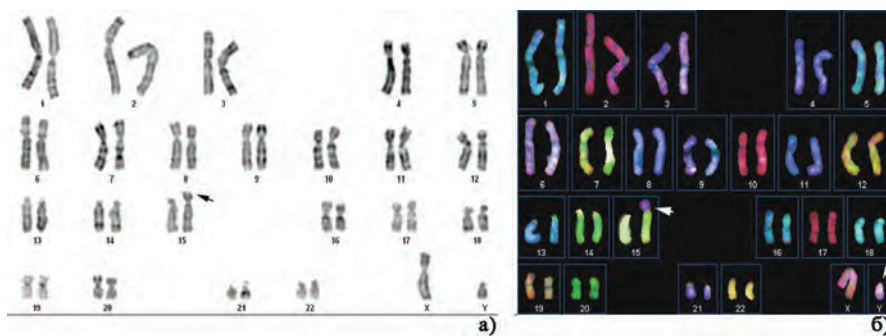


Рис.2. Раскладка хромосом пациента 2: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование

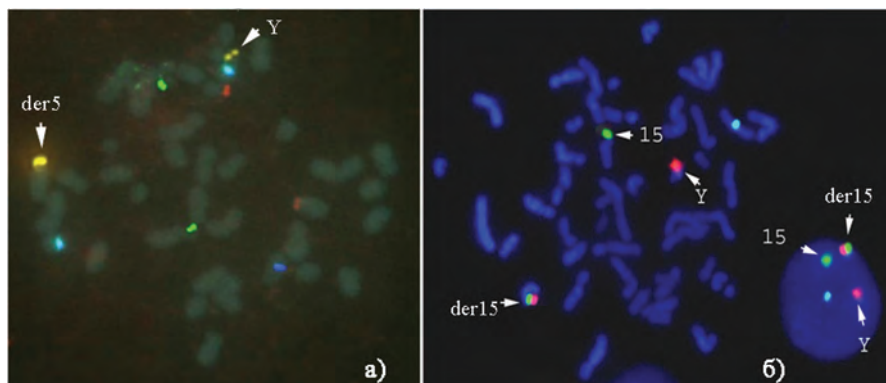


Рис.3. FISH на метафазной пластинке, выявляющая точки разрыва в DYZ1-регионе Y-хромосомы: а) пациента 1 (голубой сигнал – хромосома 18, синий – хромосома X, желтый – хромосома Y, красный – хромосома 13, зеленый – хромосома 21), б) пациента 2 (зеленый сигнал – хромосома 15, голубой – хромосома X, красный – хромосома Y)

сигнала на два: один на Y-хромосоме, дугой на хромосоме 5 – у пациента 1 (рис. 3,а) и на хромосоме 15 – у пациента 2 (рис.3,б). Так у обоих пациентов определена принадлежность добавочного хромосомного материала к Y-хромосоме и установлена точка разрыва в DYZ1-регионе Y-хромосомы (сателлит III (Yq12)).

Хромосомное нарушение пациента 2 не имеет клинического проявления, в то время как у пациента 1 наблюдается тяжелая олигозооспермия в анамнезе. Из данных литературы известно, что несбалансированные транслокации ведут к нарушению сегрегации хромосом при образовании гамет, что, в свою очередь, может служить причиной патологии плода [4].

Случай 3

Маркерная хромосома в кариотипе пациента 3 (рис.4,а) была идентифицирована методом SKY при этом программа для анализа изображений «Sky View» позволила выявить на маркерной хромосоме сигналы ДНК-зондов специфичных сразу двум хромосомам: 15 и 22: 47,XY,+der(15;22) (рис.4,б). Полученный результат обусловлен наличием в прицентромерных районах этих хромосом кластеров гомологичных последовательностей.

Для уточнения происхождения маркерной хромосомы далее были использованы FISH-зонды на центромеру и теломеру длинного плеча хромосомы 15. При этом нами установлено происхождение маркерной



Рис.4. Молекулярно-цитогенетическое исследование состава маркерной хромосомы пациента 3: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование, в) FISH, выявляющая инвертированную дупликацию длинного плеча хромосомы 15 (голубой сигнал – центромера хромосомы 15, оранжевый – теломера длинного плеча хромосомы 15)

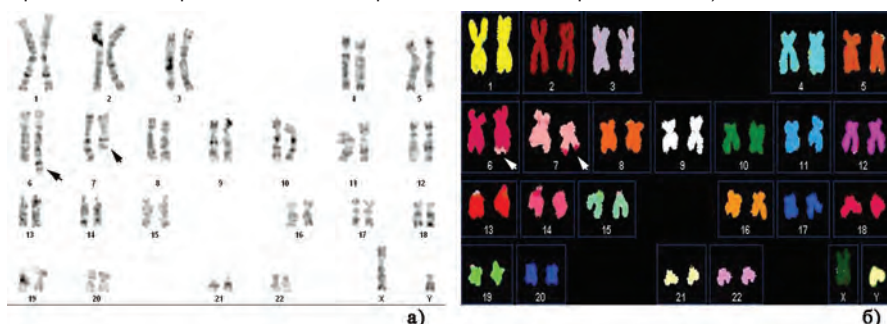


Рис.5. Раскладка хромосом пациента 4: а) GTG-окрашивание, б) спектральное кариотипирование

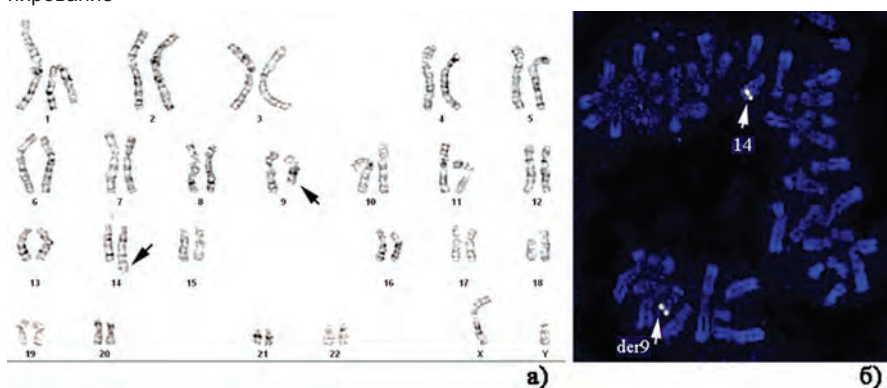


Рис.6. Результаты анализа точек разрывов при транслокации пациента 5: а) GTG-окрашивание, б) FISH с зондом на теломеру длинного плеча хромосомы 14 (желтый сигнал)

хромосомы, как инвертированной дупликации фрагмента хромосомы 15: 47,XY,+inv dup(15)(q11) (рис.4,в). На основании анализа 300 клеток крови установлено мозаичное носительство маркерной хромосомы, которая выявлялась в 89,5% клеток: mos47,XY,+inv dup(15)(q11)[284]/46,XY[23].

Причины нарушения репродуктивной функции у носителей маркерных хромосом в кариотипе остаются неясными [7]. Предполагается, что к нарушениям мейотического процесса у носителей бисателлитных маркерных хромосом может приводить превышающий оптимальный уровень NOR-активности или присутствие дополнительного гетерохроматина [11].

Случай 4

При кариотипировании клеток крови пациента 4 выявлена несбалансированная транслокация: 46,XY,der(6),t(

6;7)(q25;q32) (рис.5,а). Нами использован метод спектрального кариотипирования который показал наличие небольшого фрагмента хромосомы 6 на хромосоме 7. Было сделано заключение о реципрокной транслокации с двумя точками разрывов: 46,XY,t(6;7)(q25;q32) (рис.5,б).

Случай 5

Пациенту 5 изначально был поставлен диагноз несбалансированная транслокация в кариотипе 46,XY,der(14),t(9;14)(q22;q32) (рис.6,а). В дальнейшем нами был проведен FISH-анализ с зондом на теломеру 14q. В результате установлена сбалансированная перестройка: 46,XY,t(9;14)(q22;q32) (рис.6,б). Для ПГД-анализа данного случая предложена комбинация FISH-зондов на центромерный регион хромосомы 9 и теломерный – хромосомы 14.

В литературе показана ассоциация транслокации (9;14) с аменореей у женщин [10], нарушениями развития плода [6].

Заключение

В трех из пяти случаев нами было использовано сочетание FISH и SKY. Метод SKY позволил установить происхождение транслоцированного материала, а FISH – точки разрывов на хромосомах. Нам удалось установить в двух случаях сбалансированные транслокации, в двух – несбалансированные и в одном – состав маркерной хромосомы.

Таким образом, методы FISH и SKY являются необходимыми при уточнении цитогенетического заключения в сложных случаях, подборе оптимальной схемы ПГД-диагностики и отборе сбалансированных эмбрионов.

Литература

1. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова.-СПб.: Издательства Н-Л, 2007.-640с.
2. Захаров А.Ф. Хромосомы человека (Атлас) / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.А. Барановская.- М.: Медицина, 1982.- 264с.
3. Benet J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers / J. Benet, M. Oliver-Bonet, P. Cifuentes, C. Templado, J. Navarro // Cytogenetic and Genome Research.- 2005.-№111.- P. 281-290.
4. Fukada Y. Prenatal confirmation of the translocation between chromosome 15 and Y-chromosome by Fluorescence in situ hybridization / Y. Fukada, T. Yasumizu, A. Anemya // Tohoku J Exp Med.- 1998.- №187.- P. 285-289.
5. Gutierrez-Mateo C. Aneuploidy 12 in a robertsonian (13;14) carrier: case report / C. Gutierrez-Mateo, L. Gadea, J. Benet, D. Wells, S. Munne, J. Navarro // Human Reproduction.- 2005.-Vol.20, №5.- P.1256-1260.
6. Leube B. Unbalanced cryptic translocation der(14)t(9;14)(q34.3;q32.33) identified by subtelomeric FISH / B. Leube, F. Majewski, M. Drechsler, B. Royer-Pokora // Clin Dysmorphol.- 2003.- Vol.12, №4.- P.:261-266.
7. Manvelyan M. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature / M. Manvelyan, M. Riegel, M. Santos // Int. J. Mol. Med.- 2008.- Vol. 21, №6.- P.705-714.
8. Morel F. Meiotic segregation of translocations

during male gametogenesis / F. Morel, N. Douet-Guilbert, M.-J. Le Bris, A. Herry, V. Amice, J. Amice, M. De Braekeleer // *Int J Androl.* -2004.-№27.-P.200–212.

9. Pujol A. The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers / A. Pujol, J. Benet, C. Staessen, E. Van Assche, M. Campillo, J. Egozcue, J. Navarro // *Reproduction.* -2006.-№131.-P.1025–1035.

10. Rajangam S. Cytogenetic studies in

amenorrhea / S. Rajangam, L. Nanjappa // *Saudi Med J.* -2007.-Vol.28, №2.-P.187-92. Sermon, K. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001 / K. Sermon, C. Moutou, J. Harper, J. Geraedts, P. Scriven, L. Wilton, M.C. Magli, A. Michiels, S. Viville, C. De Die // *Hum Reprod.* -2005.-Vol.20, №1.-P.19-34.

11. Vulcani-Freitas T.M. Infertility and marker chromosomes: Application of molecular cytogenetic techniques in a case of inv dup(15) / T.M. Vulcani-

Freitas, V.L. Gil-da-Silva-Lopes, M. Varella-Garcia, A.T. Maciel-Guerra // *J Appl Genet.* -2006.-Vol. 1, № 47.-P. 89–91.

12. Wiland E. The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth / E. Wiland, A.T. Midro, B. Panasiuk, M. Kurpisz // *Journal of Andrology.* -2007.-Vol. 28, №2.-P.262-272.

И. Б. Фаткуллина, Л.Ц. Содномова, Е.Р. Еремина, Л.Л. Алексеева, А.В. Тыхеренова

РОЛЬ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ В РАЗВИТИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

УДК 61.8.3-008.6-092:612.6.05

Роль наследственности в развитии заболеваний женской репродуктивной системы и патологии, развивающейся во время беременности, издавна является одним из наиболее важных вопросов, которые интересуют практикующих врачей и исследователей. Еще в 1873 г. G. Elliot впервые опубликовал описание случая эклампсии у матери и ее четырех дочерей со смертельным исходом (за исключением одной из дочерей) [7]. Все чаще в современной литературе можно встретить упоминание о роли наследственных факторов, предрасполагающих к развитию определенного патологического состояния или заболевания (гестоз, первичное и вторичное бесплодие, привычное невынашивание беременности, эндометриоз, плацентарная недостаточность, климатерический синдром) [6, 9, 10, 11, 12].

Преэклампсия, или гестоз, занимает лидирующие позиции в патологии беременности и является одной из наиболее значительных проблем современного акушерства. В настоящее время частота этого состояния колеблется от 7 до 22% [8]. В структуре причин материнской смертности в Российской Федерации преэклампсия, стабильно занимая 3-е место, составляет от 11,8 до 14,8% и остается основной причиной заболеваемости и смертности новорожденных [8]. По данным ВОЗ, у

каждого пятого ребенка, родившегося от матери с преэклампсией, в той или иной степени нарушено физическое и психомоциональное развитие, значительно выше уровень заболеваемости в младенческом и раннем детском возрасте. Причины развития преэклампсии зависят от многих факторов и до конца не изучены. Несмотря на многочисленные исследования, во всем мире до сих пор нет единого мнения о причинах возникновения преэклампсии. Несомненно, что заболевание непосредственно связано с беременностью, так как прекращение последней всегда способствует выздоровлению. Существует несколько взаимодополняющих гипотез развития преэклампсии, к ним относятся неврогенная, почечная, плацентарная, иммунологическая и генетическая теории [1, 8]. Согласно данным исследований последних лет, генетический компонент заболевания может составлять до 50% всех факторов, влияющих на развитие преэклампсии [8].

Одним из основных направлений исследований преэклампсии, цель которых – подтверждение генетической теории, является изучение так называемых генов-кандидатов [2]. Если продукт экспрессии гена может прямо или косвенно участвовать в развитии изучаемой болезни, то этот ген принято называть геном-кандидатом. Особенностью многих вариантных генов является то, что они могут долгое время никак себя не проявлять. Патологические симптомы могут возникать при дополнительных условиях (особенности питания, беременность, образ жизни и т.д.). В связи со сложной патофизиологией преэклампсии список генов-кандидатов, предрасполагающих к преэклампсии, огромен. Из генетических маркеров артериальной гипертензии и преэклампсии исследуются инсерционно-делеционный полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE); полиморфизм гена эндотелиальной синтазы (eNOS); A1166C

полиморфизм гена рецептора I типа ангиотензина II; полиморфизм гена аполипопротеина E (APOE); полиморфизм генов *PLAT*, *PAI-I*; полиморфизм генов плацентарной глутатионтрансферазы (*GSTP1*), цитокина, фактора некроза опухолей (*TNF-α*) и другие [2].

В настоящее время интенсивно изучается фермент гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), снижение которого является одной из важных причин накопления гомоцистеина в организме, что в свою очередь ведет к риску развития сосудистых осложнений и преэклампсии у беременных [3, 14]. Известно около двух десятков мутаций в гене *MTHFR*. Наиболее изученным является вариант, в котором нуклеотид цитозин (C) в позиции 677, относящейся к 4-му экзону, заменен на тимидин (T), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата, приводит к дефициту цитоплазматической *MTHFR* и повышению уровня гомоцистеина в плазме крови из-за подавления его метаболизма. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термоллабильность *MTHFR* и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения [9]. По частоте аллеля *MTHFR* *677T существуют значительные межрасовые и межэтнические различия. Чаще всего ген встречается у европейцев 32-40% [14], реже всего – у чернокожих африканцев от 5% и аборигенов Австралии и Шри-Ланки, до 20% у азиатов [17].

По некоторым данным литературы, имеется выраженная тенденция прямой зависимости частоты встречаемости мутации *MTHFR* C677T от тяжести преэклампсии [2]. Мутация C677T в гене *MTHFR* наиболее часто встречается при тяжелых формах преэклампсии (77,8%) и повторной преэклампсии (86,7%). У женщин с мутацией C677T *MTGFR* достоверно повышен риск развития тяжелой преэклампсии при последующих беременностях

ФАТКУЛЛИНА Ирина Борисовна - зав. кафедрой акушерства и гинекологии ГОУ ВПО БГУ, зам. гл. врача Республикан. перинатального центра, г. Улан-Удэ, e-mail: fib1971@mail.ru; **СОДНОМОВА Лилия Цыдендамбаевна** – врач генетик Детской республикан. клинич. больницы, г. Улан-Удэ; **ЕРЕМИНА Елена Робертовна** – директор Бурятского филиала Томского НИИ генетики, ст. препод. Бурятского гос. ун-та; **АЛЕКСЕЕВА Лилия Лазаревна** – врач акушер-гинеколог Республикан. перинатального центра, г. Улан-Удэ, ст. препод. Бурятского гос. ун-та; **ТЫХЕРЕНОВА Аурика Вячеславовна** – студентка VI курса мед. факультета Бурятского гос. ун-та, e-mail: aurika-t@mail.ru.