

В. С. БАРАНОВ, Т. В. КУЗНЕЦОВА

ЦИТОГЕНЕТИКА

ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА



Санкт-Петербург
Издательство Н-Л
2007

ББК 28.704
УДК 612.646–075.6:575
С.5-24

Рецензенты:

Е.К.Гинтер – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор Медико-генетического научного центра РАМН (Москва)

В.П. Пузырев – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ медицинской генетики Томского научного центра Сибирского отделения РАМН

Все права защищены ©

С.5-24 Баранов В.С., Кузнецова Т. В.

Цитогенетика эмбрионального развития человека: *Научно-практические аспекты* / Баранов В. С., Кузнецова Т. В. — СПб: Издательство Н-Л, 2006. — 640 с.: 141 ил.

ISBN 5-94869-034-2

В монографии изложены современные представления об этиологии и патогенезе хромосомных болезней. Рассмотрены основные стадии гаметогенеза и эмбриогенеза человека, вклад хромосомных нарушений в патологию человека на разных стадиях внутриутробного развития и в постнатальном периоде, механизмы возникновения хромосомных aberrаций, методы их детекции в проэмбриональном и эмбриональном периодах, современное состояние и существующие алгоритмы пренатальной диагностики хромосомных болезней. Большое внимание уделяется роли пренатальной диагностики как новому многообещающему подходу для понимания особенностей функциональной активности генома и его отдельных элементов — хромосом на ранних стадиях онтогенеза человека. С позиции функциональной геномики дано представление о новом научном направлении — цитогенетике эмбрионального развития человека.

Монография предназначена для специалистов в области пренатальной диагностики, прежде всего, для врачей-цитогенетиков, медицинских генетиков, ученых, занимающихся проблемами генетики — цитогенетики развития, врачей и преподавателей курсов повышения квалификации по медицинской генетике, студентов медицинских вузов и студентов биологических факультетов университетов, интересующихся практическими и фундаментальными проблемами пренатальной диагностики и цитогенетики развития.

ББК 28.704
УДК 612.646–075.6:575

© Баранов В.С., Кузнецова Т.В.; 2007

© Издательство Н-Л; 2007

© Дизайн обложки Бурова М.В.

ISBN 5-94869-034-2

*ВИЗГЕРТ Регине Викентьевне,
БАРАНОВУ Сергею Никитовичу и
КУЗНЕЦОВЫМ Нине Александровне и Владимиру Ивановичу
посвящается...*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЖ	– амниотическая жидкость
АТ-БДУ	– антитела к бромдезоксисуридину
АТ-Мec	– антитела к 5-метилцитозину
АФП	– альфафетопротеин
БДУ	– бромдезоксисуридин
ВЗРП	– внутриутробная задержка развития плода
ВКМ	– внутренняя клеточная масса
ВПР	– врожденные пороки развития
ВПТ	– второе полярное тельце
ДЗНТ	– дефекты зарощения нервной трубки
ДМЖП	– дефект межжелудочковой перегородки
д.п.о.	– день после оплодотворения
д.р.	– день развития
КАЖ	– клетки амниотической жидкости
ККА	– количественный кариологический анализ
КТП	– короткие tandemные повторы
КТР	– копчиково-теменной размер
МВПР	– множественные врожденные пороки развития
МСБ	– маркерные белки в сыворотке крови
МЦСК	– метилцитозинсвязывающий комплекс
н.б.	– недели беременности
НПК	– незрелые половые клетки
ОПМ	– ограниченный плацентарный мозаицизм
ОРД	– однородительская дисомия
ПД	– пренатальная диагностика
п.н.	– пар нуклеотидов ДНК
ППК	– первичные половые клетки
ППТ	– первое полярное тельце
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
<i>p</i> -гены	– рибосомные гены
сатДНК	– сателлитные повторы ДНК
ТВП	– толщина воротникового пространства
Tc	– трисомия
УЗ	– ультразвук
УЗИ	– ультразвуковое исследование
УЗМ	– ультразвуковой маркер хромосомных болезней
ХГЧ	– хорионический гонадотропин человека
ЭКО	– экстракорпоральное оплодотворение
ЯО	– ядрышкового организаторы
ЯОР	– ядрышкообразующие районы хромосом
Ag-NOR	– окрашенные азотнокислым серебром ЯОР
AZF	– фактор азооспермии
CGH	– сравнительная геномная гибридизация
FISH	– флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>
MoM	– (англ. – multiples of median) кратность медиане
PAPP-A	– ассоциированный с беременностью протеин А
PRINS	– полимеразная цепная реакция <i>in situ</i>
QF-PCR	– количественная полимеразная цепная реакция
Rh	– резус-фактор
SKY	– спектральное кариотипирование

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	13
ВВЕДЕНИЕ	15
ГЛАВА 1	
ОСНОВЫ ПРОЭМБРИОНАЛЬНОГО И ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА	19
Введение	19
1.1. Проэмбриональный период	23
1.1.1. Гаметогенез.....	23
1.1.1.1. Сперматогенез	24
1.1.1.2. Оогенез.....	27
1.1.2. Оплодотворение	30
1.2. Презэмбриональный период	32
1.2.1. Доимплантационный период (дробление, компактизация, бластуляция)	33
1.2.2. Имплантация и раннее постимплантационное развитие	36
1.3. Эмбриональный период	41
1.4. Плодный период	53
Заключение	54
ГЛАВА 2	
НОРМАЛЬНЫЙ КАРИОТИП ЧЕЛОВЕКА	55
Введение	55
2.1. Краткая характеристика цитогенетических методов	58
2.2. Особенности кариотипа человека	60
2.3. Полиморфизм хромосом человека	64
2.4. Краткая характеристика молекулярной гетерогенности сегментов хромосом человека	67
Заключение	71
ГЛАВА 3	
МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА	72
Введение	72
3.1. Классификация хромосомных аномалий	72
3.1.1. Геномные мутации.....	72
3.1.2. Хромосомные мутации.....	74
3.1.2.1. Межхромосомные перестройки.....	74
3.1.2.2. Внутрихромосомные перестройки	75
3.2. Механизмы возникновения геномных мутаций	76

3.2.1. Триплоидия ($3n = 69$)	76
3.2.2. Тетраплоидия ($4n = 92$)	76
3.2.3. Анеуплоидия	77
3.2.3.1. Основные механизмы возникновения анеуплоидии	78
3.2.3.1.1. Собственно нерасхождение хромосом	78
3.2.3.1.2. Предделение	78
3.2.3.1.3. Запаздывание хромосом	78
3.2.3.1.4. Первичное и вторичное нерасхождение хромосом	80
3.2.3.2. Роль рекомбинации в нерасхождении хромосом	81
3.2.3.3. Генетический контроль мейоза	82
3.2.4. Мозаицизм хромосом	83
3.2.5. Однородительская дисомия	84
3.3. Механизмы возникновения хромосомных мутаций	85
Заключение	95

ГЛАВА 4

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ В ГАМЕТОГЕНЕЗЕ И ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Введение	97
4.1. Общие представления о цитогенетике гаметогенеза	98
4.2. Методы исследования сперматогенеза	100
4.2.1. Цитологические методы	101
4.2.1.1. Спермограмма	101
4.2.1.2. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток	102
4.2.2. Цитогенетические методы	106
4.2.2.1. Анализ хромосом сперматоцитов	106
4.2.2.2. Анализ синаптонемных комплексов	108
4.2.2.3. Анализ хромосомного набора сперматозоидов	110
4.2.2.3.1. Метод гетерологичного оплодотворения	111
4.2.2.3.2. Метод FISH	111
4.2.3. Молекулярно-генетические методы исследования мужского бесплодия	113
4.3. Методы исследования оогенеза	117
4.3.1. Анализ хромосом в первом делении мейоза	117
4.3.1.1. Профаза I	117
4.3.1.2. Метафаза I	121
4.3.1.3. Первое полярное тельце	122
4.3.2. Анализ хромосом во втором делении мейоза	123
4.3.2.1. Метафаза II	124
4.3.2.2. Второе полярное тельце	124
4.3.3. Перспективные методы анализа мейотических хромосом	127
4.4. Методы исследования хромосом в раннем эмбриогенезе	128
4.5. Методы исследования хромосом в постимплантационном периоде	129
4.5.1. Клетки хориона (плаценты)	131

4.5.1.1. Культивирование клеток хориона.....	132
4.5.1.2. «Прямые» препараты.....	132
4.5.1.3. Митотическая активность клеток цитотрофобласта.....	134
4.5.2. Клетки амниотической жидкости.....	139
4.5.3. Лимфоциты пуповинной крови плода.....	143
4.6. Принципы изучения генеза хромосомных аномалий в постимплантационном и постнатальном периодах онтогенеза.....	144
4.6.1. Происхождение гетероплоидии.....	146
4.6.2. Происхождение хромосомных мутаций.....	148
Заключение.....	149

ГЛАВА 5

ЧАСТОТА И СПЕКТР ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ В ГАМЕТОГЕНЕЗЕ И НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА.....

Введение.....	150
5.1. Хромосомные аномалии в гаметогенезе.....	150
5.1.1. Сперматогенез.....	151
5.1.2. Оогенез.....	153
5.1.2.1. Метафаза I.....	154
5.1.2.2. Метафаза II.....	154
5.1.2.3. Завершение мейоза.....	157
5.2. Хромосомные аномалии в эмбриогенезе.....	158
5.2.1. Доимплантационные стадии развития.....	158
5.2.1.1. Полиплоидия.....	159
5.2.1.2. Анеуплоидия.....	161
5.2.1.3. Мозаичная гетероплоидия.....	162
5.2.2. Постимплантационные стадии развития.....	163
5.3. Спектр спонтанных хромосомных аномалий на разных стадиях развития.....	168
5.3.1. Трисомия аутомсом.....	169
5.3.2. Двойные трисомии.....	173
5.3.3. Моносомия.....	174
5.3.4. Полиплоидия.....	174
Заключение.....	174

ГЛАВА 6

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЧАСТОТУ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ.....

Введение.....	176
6.1. Возраст.....	178
6.2. Гетерозиготное носительство структурных перестроек хромосом.....	181
6.2.1. Реципрокные транслокации.....	182
6.2.2. Робертсоновские транслокации.....	186
6.2.3. Инверсии.....	192
6.3. Численные хромосомные аномалии кариотипа у родителей.....	197

6.3.1. Мозаичные варианты трисомии 21	197
6.3.2. Аномалии числа половых хромосом	198
6.3.2.1. Синдром Клайнфельтера (47,XXY).....	199
6.3.2.2. Синдром дисомии по Y-хромосоме (47,XYY)	199
6.3.2.3. Синдром Трипло-X (47,XXX)	200
6.3.2.4. Синдром Шерешевского–Тернера (45,X и другие аномалии кариотипа)	200
6.3.3. Сверхчисленные маркерные хромосомы (47,XX,+mar или 47,XY,+mar).....	203
6.4. Другие наследственные факторы анеуплоидии	206
6.5. Физические и биологические факторы	212
Заключение	215

ГЛАВА 7

ХРОМОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ.....	217
Введение	217
7.1. Механизмы возникновения хромосомного мозаицизма	219
7.1.1. Хромосомный мозаицизм на доимплантационных стадиях.....	220
7.1.2. Хромосомный мозаицизм после имплантации	224
7.1.3. Хромосомный мозаицизм в постнатальном периоде	228
7.2. Мейотический и митотический мозаицизм	232
7.3. Однородительская дисомия	234
7.4. Проблемы пренатальной диагностики мозаицизма.....	236
7.5. Влияние плацентарного мозаицизма на течение и исход беременности.....	239
7.6. Теоретические аспекты хромосомного мозаицизма	244
Заключение	245

ГЛАВА 8

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОНОВ И ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА С ХРОМОСОМНЫМИ АНОМАЛИЯМИ.....	247
Введение	247
8.1. Множественные врожденные пороки развития	248
8.2. Хромосомные аномалии как ранние эмбриональные летали	254
8.3. Фенотипические проявления хромосомных аномалий в I триместре беременности	257
8.4. Фенотипические проявления хромосомных аномалий во II триместре беременности	268
8.4.1. Трисомия 21	273
8.4.2. Трисомия 18	276
8.4.3. Трисомия 13.....	279
8.4.4. Моносомия X	280
8.4.5. Кариотипы 47,XXY и 47,XXX	280
8.4.6. Триплоидия.....	281
8.5. Стратегия исследований корреляций кариотип — фенотип в эмбриогенезе человека	281
Заключение	287

ГЛАВА 9

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ	288
Введение	288
9.1. Предмет и задачи пренатальной диагностики	289
9.2. Методы оценки состояния плода	290
9.3. Медико-генетическое консультирование	295
9.4. Скринирующие методы исследования состояния плода	298
9.4.1. Ультразвуковой скрининг	299
9.4.2. Биохимический скрининг	303
9.4.2.1. Биохимический скрининг во II триместре беременности	304
9.4.2.2. Биохимический скрининг в I триместре беременности	307
9.4.3. Цитогенетический скрининг	308
9.4.3.1. Скрининг по возрасту	311
9.4.3.2. Наличие ребенка (плода) с хромосомной болезнью в анамнезе	317
9.4.3.3. Наличие ребенка (плода) с МВПР в анамнезе	321
9.4.3.4. Аномалии кариотипа у родителей	323
9.4.4. Молекулярный скрининг	325
9.4.5. Иммунологический скрининг	325
9.5. Показания для направления на инвазивную пренатальную диагностику	326
9.6. Инвазивные методы получения плодного материала	329
9.7. Принципы и методы диагностики хромосомных болезней	330
9.7.1. Особенности цитогенетического анализа клеток различного плодного происхождения	332
9.7.1.1. Клетки амниотической жидкости	332
9.7.1.2. Клетки ворсин хориона (плаценты)	333
9.7.1.3. Лимфоциты пуповинной крови плода	334
9.7.2. Основные принципы цитогенетического анализа в пренатальной диагностике	334
9.7.2.1. Состав и квалификация персонала	335
9.7.2.2. Оборудование	335
9.7.2.3. Реактивы	335
9.7.2.4. Показатели качества цитогенетических исследований	335
9.7.3. Диагностические проблемы кариотипирования плода	339
9.7.3.1. Структурные перестройки хромосом, возникшие <i>de novo</i>	339
9.7.3.2. Маркерные хромосомы	343
9.7.3.3. Мозаицизм хромосом	345
9.7.3.4. Однородительская дисомия	349
9.7.4. Алгоритм пренатальной диагностики хромосомных болезней	349
9.8. Принципы и методы диагностики моногенных болезней	353
9.9. Прерывание беременности и верификация диагноза	354
9.10. Эффективность пренатальной диагностики	358
9.11. Пренатальная диагностика в III триместре беременности	360
9.12. Современные направления в пренатальной диагностике	362
9.12.1. Доимплантационная диагностика	362

9.12.2. Неинвазивные методы пренатальной диагностики	366
9.12.2.1. Клетки плода в трансцервикальных образцах	366
9.12.2.2. Клетки и ДНК плода в крови матери	367
9.12.3. Комбинированный пренатальный скрининг хромосомных болезней в I триместре	368
9.12.4. Молекулярная диагностика хромосомных болезней	370
9.12.5. Генная и клеточная терапия плода	371
Заключение	373

ГЛАВА 10

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА.....375

Введение

10.1. Особенности структурной организации ядрышкообразующих районов хромосом человека.....376

10.1.1. Полиморфизм ядрышкообразующих районов (ЯОР)
хромосом

10.1.2. Механизмы регуляции функциональной
активности рибосомных генов

10.1.3. Характеристика функционального состояния ЯОР
в эмбриогенезе человека

 10.1.3.1. Полиморфизм ЯОР у эмбрионов 6,5–14 недель развития

 10.1.3.2. Полиморфизм ЯОР у плодов 20–24 недель развития

10.1.4. Особенности наследования функциональной
активности ЯОР

10.1.5. Функциональный полиморфизм ЯОР у плодов человека
с анеуплоидным кариотипом

10.2. Метилирование ДНК как универсальный механизм регуляции активности генов.....399

10.2.1. Метилирование ДНК и геномный импринтинг

10.2.2. Инактивация X-хромосомы

10.2.3. Болезни, обусловленные нарушениями метилирования

10.2.4. Роль метилирования в онкогенезе

10.2.5. Статус метилирования хромосом в эмбриогенезе человека

10.3. Анализ статуса метилирования хромосом с помощью метода ник-трансляции *in situ*.....414

10.3.1. Общая характеристика функционального статуса
хромосом у эмбрионов человека

10.3.2. Характеристика прицентромерных районов и коротких плеч
acrocentрических хромосом

10.3.3. Особенности функционального состояния районов
прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16

10.3.4. Особенности метилирования хромосом при анеуплоидии

10.4. Анализ особенностей метилирования метафазных хромосом человека с помощью моноклональных антител.....429

10.4.1. Принцип метода и новый вариант дифференциальной
окраски — M-сегментация

10.4.2. Некоторые особенности паттерна метилирования хромосом в эмбриогенезе человека	436
10.4.2.1. Характеристика М-сегментации хромосом из лимфоцитов пуповинной крови у плодов 20–24 недель развития	436
10.4.2.2. Общая характеристика М-сегментации хромосом у эмбрионов 5–8 недель развития	439
10.4.2.3. Особенности М-рисунка хромосом у эмбрионов доимплантационных стадий развития	440
10.5. Морфометрические характеристики гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16	444
10.6. Особенности репликации хромосом в эмбриогенезе человека	449
Заключение	456

ГЛАВА 11

ГОРИЗОНТЫ ЦИТОГЕНЕТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО

РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА	460
Введение	460
11.1. Особенности структурно-функциональной организации хромосом на начальных стадиях развития	462
11.2. Структурная и функциональная роль гетерохроматина	465
11.3. Метилирование ДНК в эмбриогенезе	469
11.4. Цитологические факторы регуляции активности генов в эмбриогенезе	472
11.5. Феногенетика хромосомной патологии	475
11.6. Некоторые перспективы диагностики, профилактики и лечения хромосомных болезней	483
11.6.1. Диагностика	483
11.6.2. Профилактика	484
11.6.3. Лечение	486
11.7. Новые направления цитогенетики эмбрионального развития человека	487
Заключение	488

ПРИЛОЖЕНИЕ	490
-------------------------	------------

1. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ	490
1.1. Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов периферической крови	490
1.2. Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов пуповинной крови плода	492
1.3. Тест для оценки контаминации пуповинной крови плода кровью матери	492
1.4. Приготовление препаратов хромосом из ворсин хориона или плаценты	492
1.5. Приготовление препаратов хромосом из различных эмбриональных органов	495

2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА НЕОКРАШЕННЫХ И РАВНОМЕРНО ОКРАШЕННЫХ ХРОМОСОМ	497
2.1. Фазово-контрастная микроскопия.....	497
2.2. Рутинная окраска хромосом.....	497
3. МЕТОДЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ОКРАСКИ ХРОМОСОМ	498
3.1. Методы G-окраски хромосом.....	498
3.2. Методы R-окраски хромосом (RNG, RFA).....	500
3.3. Методы Q-окраски хромосом (QFQ, QFH).....	501
3.4. Методы избирательной окраски гетерохроматиновых районов хромосом.....	504
4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	506
4.1. Репликационные варианты G- и R-дифференциального окрашивания хромосом.....	507
4.2. Методы выявления ломкой X-хромосомы.....	511
5. ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ <i>IN SITU</i> (FISH)	510
5.1. ДНК-зонды.....	512
5.2. Приготовление препаратов хромосом и интерфазных ядер.....	517
5.3. Предгибризационная обработка препаратов.....	520
5.4. Гибридикация <i>in situ</i>	523
6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ХРОМОСОМНЫХ РАЙОНОВ	533
6.1. Ag-окраска активных ядрышкообразующих районов хромосом.....	533
6.2. Выявление районов, обогащенных метилцитозином.....	535
7. ПРОПИСИ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	538
7.1. Стандартный фосфатный буфер Соренсена (рН 6,8).....	538
7.2. Буферный раствор GKN, рН 7,8 (10-кратный).....	538
7.3. Буферный раствор SKN, рН 7,8.....	538
7.4. Буферные растворы SSC.....	539
7.5. Раствор версена.....	539
7.6. Na-фосфатный буфер (0,01 M).....	539
7.7. Насыщенный солевой буферный раствор Дюльбекко, рН 7,2.....	540
7.8. Цитратно-фосфатный буфер Мак-Ильвейна.....	540
Таблица 1. Характеристика методов дифференциального окрашивания хромосом, часто используемых в цитогенетике человека.....	541
Таблица 2. Сокращения при описании хромосом и хромосомных аномалий.....	543
Рис.1. Идиограммы G-сегментации хромосом человека для уровней разрешения – 300, 400, 550, 700 и 850 сегментов на гаплоидный геном.....	546
ЛИТЕРАТУРА	565
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	611

ПРЕДИСЛОВИЕ

Представляя читателям монографию члена-корреспондента РАМН В. С. Баранова и доктора биологических наук Т. В. Кузнецовой, хочу подчеркнуть своевременность ее опубликования.

Закономерности эмбрионального развития человека в последние годы все больше и больше подвергаются тонкому генетическому анализу. Выявлены многие генетические механизмы регуляции ранних этапов эмбриогенеза. Продолжаются интенсивные поиски транскрипционных факторов, определяющих развитие определенных структур «в нужном месте и в нужное время».

Регуляция эмбриогенеза — сложнейший процесс. Расшифровка его осуществляется на геномном, хромосомном и клеточном уровнях. Хромосомный уровень изучения эмбриогенеза — назовем его цитогенетикой онтогенеза — мало освещен и в зарубежной, и в отечественной литературе. В содержательной книге С. А. Назаренко «Изменчивость хромосом и развитие человека» (Томск, 1993) были отражены лишь некоторые стороны цитогенетики эмбрионального развития. Пробел в этом важном разделе современной медицины и биологии восполняет настоящая монография.

Авторы книги хорошо известны по многим первоклассным публикациям, и неудивительно, что они написали хорошую книгу, в которой отражен собственный большой опыт по цитогенетическим исследованиям эмбрионов и плодов (более 8000) наряду с глубоким анализом литературы. Мне приятно отметить глубокое уважение авторов к отечественным школам

эмбриологов (П. Г. Светлов, А. Г. Кнорре, А. П. Дыбан) и цитогенетиков (А. А. Прокофьева-Бельговская, А. Ф. Захаров, С. А. Назаренко).

Положительным моментом книги является обстоятельная общеэмбриологическая информация, которой так недостаточно в нашей литературе. В ней подробно в доступной форме изложены основы проэмбрионального и эмбрионального развития человека. Сведения о нормальном кариотипе человека, механизмах возникновения хромосомных и геномных мутаций, фенотипах эмбрионов с хромосомными аномалиями преломляются под углом зрения практической значимости. Рассмотрена природа хромосомных аномалий в онтогенезе пренатального периода, что очень важно для практических целей диагностики и профилактики наследственных болезней. Цитогенетика гамето- и эмбриогенеза изложена с учетом современных генетических достижений и методических возможностей (выявление мозаицизма, импринтинга, однородительских дисомий, эпигенетической регуляции и др.).

Большое место в книге занимают вопросы пренатальной диагностики. Авторы сделали большой вклад в развитие этого раздела медико-генетической помощи в нашей стране. Изложенный ими опыт цитогенетической пренатальной диагностики полезен для практических врачей-цитогенетиков, и в то же время — это современное пособие для изучающих процессы онтогенеза человека в пренатальном периоде. Для научных сотрудников очень важна глава «Горизонты цитогенетики эмбрионального развития человека».

Книгу В. С. Баранова и Т. В. Кузнецовой можно назвать настольным руководством для врачей, преподавателей медицинской генетики, для научных работников, генетиков, эмбриологов, акушеров-гинекологов и других специалистов.

Академик РАМН Н. П. Бочков

ВВЕДЕНИЕ

Нарушениям наследственного аппарата принадлежит важное место в патологии человека. Мужская и женская стерильность, самопроизвольные аборт, рождение детей с тяжелыми аномалиями развития, многие патологические состояния постнатального периода, в том числе и хромосомные болезни, обусловлены поломками генома. По весьма приблизительным оценкам общий генетический груз в популяции оценивается величиной в 5–5,5 %, из которого только на долю новорожденных приходится около 1,5 % [31]. При этом значительная часть нарушений онтогенеза связана с численными или структурными аберрациями всего генома или отдельных хромосом, и может быть выявлена цитогенетическими методами путем анализа кариотипа гамет или клеток зародыша.

Таким образом, цитогенетические исследования играют важную роль в диагностике многих патологических состояний на разных стадиях онтогенеза человека. Их значение особенно велико, если исследования кариотипа проводятся еще до рождения, то есть в течение антенатального периода развития человека. Именно тогда хромосомные болезни можно не только диагностировать, но и предупредить путем элиминации плодов с нарушениями кариотипа. Профилактика рождения детей с хромосомными болезнями составляет главную задачу такого сравнительно нового научно-практического направления как пренатальная диагностика. На каких стадиях онтогенеза происходят поломки наследственного аппарата зародыша? Как они реализуются в фенотипе? Как они могут быть выявлены еще до рождения? Что такое хромосомный мозаицизм, ограниченный плацентой и представляет ли он угрозу для плода? Ответы на эти и другие практические вопросы пренатальной диагностики можно найти в первых 5 главах монографии.

Вместе с тем, исследования по цитогенетике эмбрионального развития человека отнюдь не исчерпываются решением практических задач пренатальной диагностики. По твердому убеждению авторов, уже

существующие сегодня возможности прижизненного исследования плодного материала на всех стадиях эмбрионального развития открывает реальные перспективы исследования функции генома в течение всего внутриутробного периода развития человека. Это позволяет непосредственно на человеке начать исследования центральной проблемы современной биологии — проблемы реализации генетической информации в индивидуальном развитии. Важная роль в таких исследованиях, безусловно, принадлежит цитогенетике развития, изучающей функции отдельных хромосом и их фрагментов в условиях хромосомного дисбаланса. Впервые на млекопитающих такой подход был использован в модельных экспериментах на мышах с хромосомными транслокациями [11, 56, 380].

К сожалению, применение цитогенетических методов в исследовании эмбриогенеза человека до появления пренатальной диагностики было значительно менее продуктивным. Выполненные на абортном материале с применением методов клеточных культур, они были весьма продуктивными только при исследовании цитологических феноменов хромосомного дисбаланса (гипотеза «клеточного синдрома») [47, 93, 96]. Они, однако, оказались малопригодными для суждения о хромосомном контроле гаметогенеза и эмбриогенеза человека. И это понятно. Исследования кариотипов абортусов, представлявших собой мацерированные ткани или остатки абортивного плодного яйца, не позволяли объективно судить о том, как дисбаланс той или иной хромосомы или ее фрагментов мог влиять на процессы развития.

Ситуация коренным образом изменилась только в 80-х годах XX века, когда благодаря успехам ультразвуковой диагностики и прогрессу в технике забора плодного материала, появилась реальная возможность прижизненного кариотипирования плода [391, 427, 694]. Масштабные цитогенетические исследования плодов в Санкт-Петербурге были начаты в 1987 году, когда в Институте акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН была организована Лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней [15, 17]. К настоящему времени в этой лаборатории комплексное цитогенетическое исследование проведено на более 8000 плодах разных стадий развития.

Становление и развитие пренатальной диагностики совпало с появлением и бурным развитием методов экстракорпорального оплодо-

творения (ЭКО), позволяющих путем трансплантации в матку оплодотворенных *in vitro* яйцеклеток, решать проблему бесплодия, связанного с непроходимостью маточных труб и с другими причинами [873]. Появление новых молекулярно-цитогенетических методов (например, метод FISH), а также точных методов ДНК-диагностики сделали возможным пренатальную диагностику генных и хромосомных болезней уже на ранних доимплантационных стадиях развития и даже на уровне гамет (ооцитов).

Таким образом, уже к концу XX-го века практически все стадии раннего развития человека, включая гаметогенез, а также до- и постимплантационный эмбриогенез, стали доступными для лабораторных исследований непосредственно на материале зародыша.

Важно отметить, что возможность прижизненного исследования плода человека на всех стадиях развития практически совпала во времени с триумфальными достижениями Международной Программы «Геном человека» [316]. Полная расшифровка первичной структуры всего генома в апреле 2003 года установление точной нуклеотидной последовательности всех 23 пар хромосом; разработка технологии одновременной регистрации экспрессионных профилей многих тысяч генов [865]; возможность визуализации работ отдельных генов и генных кластеров в интерфазном ядре [562], развитие представлений биоинформатики о «генных сетях», обеспечивающих координированную работу генных ансамблей в процессах морфогенеза [41] — все эти фундаментальные достижения составляют основу нового направления — функциональной геномики [79]. Они открывают принципиально новые, недостижимые ранее, возможности и для цитогенетики развития человека. В первую очередь, это касается проблемы структурно-функциональной организации хромосом.

Таким образом, достижения фундаментальных наук в изучении генома человека и успехи клинической медицины в области пренатальной диагностики предопределили возросший интерес к цитогенетике развития человека, сделали весьма актуальным изучение особенностей гаметогенеза и ранних стадий эмбриогенеза человека при помощи традиционных и современных нетрадиционных методов хромосомного анализа.

Некоторые данные об особенностях структурно-функциональной организации хромосом на разных стадиях эмбриогенеза человека приведены в главе 10.

В заключительной главе книги (глава 11) суммированы взгляды авторов на перспективы дальнейших исследований в области пренатальной диагностики и в плане изучения функции генома и его отдельных элементов (хромосом) на разных стадиях гаметогенеза и эмбриогенеза человека.

Кроме того, нам казалось целесообразным дополнить теоретические данные и практические результаты собственных исследований методами приготовления хромосомных препаратов из тканей зародышей человека на разных стадиях развития.

Данная книга является первой монографией, посвященной проблемам цитогенетики эмбрионального развития человека. Авторы вполне отдают себе отчет в том, что это, безусловно, в высшей степени прогрессивное направление функциональной геномики делает только первые шаги, и многие актуальные вопросы структурно-функциональной организации хромосом пока остаются без ответа. Естественно, это не относится к проблемам пренатальной диагностики, где практически все проблемы уже решены. В этом плане практические аспекты цитогенетики развития значительно опережают теоретические фундаментальные аспекты индивидуального развития. Однако нет сомнения в том, что дальнейшие углубленные исследования в этом направлении позволят получить принципиально новую информацию о структурно-функциональных особенностях генома человека. Такая информация будет иметь большое теоретическое, и несомненное практическое значение не только для ранней диагностики, но и для лечения наследственных болезней.

Авторы сочтут свою задачу выполненной, если эта книга послужит руководством не только для врачей-цитогенетиков, занимающихся вопросами пренатальной диагностики, но и привлечет к себе внимание специалистов по цитогенетике и генетике человека, интересующихся проблемами онтогенеза, а также студентов мединституты и биофаков, понимающих необходимость и перспективность внедрения достижений генетики в современную медицину и биологию.

Считаем приятным долгом выразить глубокую признательность всем сотрудникам Лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний ГУ НИИАГ им. Д. О. Отта РАМН за неизменную помощь в работе над монографией. Мы особенно благодарны сотрудникам цитогенетической группы этой лаборатории.

ГЛАВА 1

ОСНОВЫ ПРОЭМБРИОНАЛЬНОГО И ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Введение

Исследования по цитогенетике эмбрионального развития человека, а также грамотное применение всего комплекса методов, связанных с пренатальной диагностикой хромосомных болезней (получение материала, цитогенетический анализ, молекулярно-цитогенетические исследования и пр.), предусматривают достаточную компетентность ученого и врача-генетика в вопросах антенатального развития человека. Такая информация особенно существенна для понимания тех этапов онтогенеза, когда происходят нарушения кариотипа, реализующиеся во время развития плода и в постнатальном периоде. Она, несомненно, важна и для понимания патогенетических механизмов возникновения хромосомных аномалий и врожденных пороков развития, выявляемых у развивающегося зародыша.

Общая продолжительность внутриутробного развития человека составляет в среднем около 280 дней и равна примерно 1 % его средней продолжительности жизни. Существует несколько различных классификаций периодов антенатального развития человека [26, 56, 80, 383, 694]. Согласно ставшей классической классификации Института Карнеги (США), основанной на уникальной коллекции зародышей человека разных стадий, эмбриогенез человека подразделяют на стадии, которые обозначают по имени автора коллекции как «горизонты Стритера» [75, 159]. Эти горизонты, основанные на гистологическом описании уникальных находок, до имплантации обозначают арабскими, а после имплантации — римскими цифрами. Всего выделяют 23 горизонта [524]. При этом первые 8 горизонтов (с 1-го по 20-й д. р.)

соответствуют периоду бластогенеза (преэмбриональный период развития), остальные 15 горизонтов (IX–XXII — с 20-го по 60-й д. р.) — периоду раннего органогенеза (эмбриональный период). Горизонты Стритера не распространяются на фетальный (60–180 д. р. — стадия XXIII) и перинатальный периоды (180–280 д. р.). Данная классификация основана на исследовании зародышей при достаточно точной регистрации срока зачатия. Естественно, что эти периоды отличаются от таковых при стандартной регистрации сроков беременности, принятой в акушерстве (плюс две недели от первого дня последних месячных). Соответственно, преэмбриональный период согласно классификации Карнеги должен примерно соответствовать первым четырем неделям беременности (1–4 н. б.), эмбриональный — 5–9 н. б., плодный — 9–40 н. б.

В практическом акушерстве используется более упрощенный вариант классификации, согласно которому I триместр беременности (до 13-й н. б.) соответствует эмбриональному периоду развития, II и III — фетальному (плодному) периоду. В последнем нередко принято выделять еще и перинатальный период — с 28-й н. б. до 7-го дня периода новорожденности [1].

С учетом целей и задач монографии в данной главе мы выделяем следующие этапы (периоды):

- проэмбриональный (гаметогенез + оплодотворение);
- преэмбриональный период (первые 20 д. р.);
- собственно эмбриональный, или период раннего органогенеза (с 21-го по 60-й д. р.);
- плодный период (после 60-го д. р. до конца беременности).

С учетом поправки на срок беременности, принятой в акушерстве (см. выше), рассматриваемые периоды приблизительно соответствуют:

- преэмбриональный — 1–4 н. б.;
- период раннего (активного) органогенеза — 5–12 н. б. включительно;
- плодный — с 13-й по 40-ю н. б.

Основные морфологические характеристики зародышей человека с 1-й по 23-ю стадии развития по классификации Карнеги от оплодотворения до плодного периода приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1. Основные морфологические характеристики зародыша человека — с 1-й по 23-ю стадии развития по классификации Карнеги [383, 524] (преэмбриональный период — стадии 1–8; эмбриональный период — стадии IX–XXII, ранний фетальный период — стадия XXIII)

Стадия по Карнеги	Возраст зародыша, дни	Менструальный возраст + 2 недели	КТР, мм	Морфологические особенности
Преэмбриональный период				
1	0–2	2 ⁰	0,2	Оплодотворение, зигота
2	2–4	2 ⁺² –2 ⁺³	0,2	От 2 до 16 бластомеров
3	4–5	3 ⁻³ –3 ⁻²	0,2	Стадия компактизации, ранняя бластоциста, образование трофобласта и внутренней клеточной массы (ВКМ)
4	5–6	3 ⁻² –3 ⁻¹	0,2	Освобождение от блестящей оболочки («хэтчинг»), начало имплантации
5	6–7	3 ⁰ –4 ⁻²	0,2	Деламинация внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты с образованием эктодермы и энтодермы (1-я фаза гаструляции); первичный желточный мешок (ЖМ); разрастание трофобласта, начало образования ворсин
6	7–15	4 ⁻¹ –4 ⁺¹	0,2–0,4	Вторичный ЖМ, эмбриональный диск грушевидной формы, 2-я фаза гаструляции, первичная полоска, кровяные островки в стенке ЖМ
7	16–18	4 ⁺¹ –4 ⁺³	0,4	Формирование трех зародышевых листков, появление хорды
8	18–20	4 ⁺³ –5 ⁻²	1,0–1,5	Формирование нервной пластинки, нервного желобка, образование первичных сосудов
Эмбриональный период				
IX	20–21	5 ⁻² –5 ⁰	1,5–2,5	Первые сомиты, вторичные ворсинки, начало формирования сердца, появление предпочки
X	21–22	5 ⁺¹ –5 ⁺²	2,0–3,5	4–12 сомитов, нервные валики начинают смыкаться в средней части, появляются 2 пары жаберных дуг, зачатки глаз, слуховые плакоды
XI	22–26	5 ⁺² –6 ⁻²	2,5–4,5	13–20 сомитов, нейропоры открыты, 3–4 пары жаберных дуг, эмбрион приобретает С-образную форму, сердечная трубка S-образная, ритмично сокращается

Таблица 1.1 (продолжение)

XII	26–30	$6^{-2}-6^{+2}$	3,0–5,0	21–29 сомитов, определяются почки верхних конечностей, закрывается задний нейропор; закладываются печень, поджелудочная железа, пищевод, трахея, легкие, клапаны и перегородка сердца, начинается развитие мышц, костей
XIII	28–32	6^0-7^{-3}	4,0–6,0	30–40 сомитов, появляются почки нижних конечностей, удлиняются и дифференцируются почки верхних конечностей, формируются слуховые пузырьки, передний, средний и задний мозг, аортальные дуги
XIV	31–35	$6^{+3}-7^0$	5,0–7,0	Верхняя конечность разделяется на плечо и предплечье, определяется зачаток кисти, видны мандибулярные и гиоидные дуги, ротовая ямка, сердце 4-камерное, формируются зачатки легких, закладка третичной (постоянной) почки, мочевого пузыря
XV	35–38	7^0-7^{+3}	7,0–10,0	Размеры мозга увеличиваются на 1/3, передний нейропор закрыт, видны 4 пары жаберных дуг, определяются мандибулярные и максиллярные дуги, носовые ямки, формируются стопы, гонады заселяются первичными половыми клетками (ППК)
XVI	37–42	$7^{+2}-8^0$	8,0–12,0	Пигментация глаз, начало оксификации костей, закладываются зубная пластинка и зачатки зубов, дифференцированы основные части конечностей
XVII	42–44	8^0-8^{+2}	11,0–14,0	Определяются закладки пальцев верхних конечностей, формируется диафрагма, появляется половой бугорок, почки начинают вырабатывать мочу
XVIII	44–47	$8^{+2}-9^{-1}$	13,0–17,0	Определяются бедро, голень, пальцы нижних конечностей, срастаются веки, появляются соски
XIX	47–51	$9^{-1}-9^{+2}$	16,0–18,0	Туловище удлиняется и несколько выпрямляется; определяются полушария мозга, ушные раковины расположены низко, глаза в боковых частях головы, развивается задний мозг
XX	51–53	$9^{+2}-10^{-3}$	18,0–22,0	Верхние конечности удлинены, согнуты в локтях, определяются коленные и голеностопные суставы, различаются пальцы стоп

Таблица 1.1 (окончание)

XXI	52–56	10^3-10^2	22,0– 24,0	Поздняя эмбриональная стадия, конечности хорошо дифференцированы, пальцы рук сжимаются, завершается формирование межпредсердной перегородки
XXII	56–60	10^2-10^0	23,0– 28,0	Глаза открыты, появляются первые извилины мозга, возникают непроизвольные движения, возможно распознавание пола по гонадам, кишка из пупочного канатика втягивается в брюшную полость
Ранний фетальный период				
XXIII	60–70	10^0-12^{+3}	27–45	Масса тела (МТ) около 10 г. Глаза закрыты веками, сформирована верхняя губа, формируется твердое небо, исчезает естественная пупочная грыжа, появляются очаги окостенения в длинных трубчатых костях, конечности хорошо сформированы, пальцы разделены
	70–77		50,0– 70,0	МТ около 20–40 г. Увеличивается масса мозга, голова наклонена вперед, гениталии дифференцированы по половому признаку, объем амниотической жидкости около 50 мл
	77–90		70,0– 90,0	МТ 45–60 г. Плод начинает двигаться, хорошо прослушивается сердцебиение, развиваются зубы, растут волосы, дифференцируются бронхи

1.1. Проэмбриональный период

Принимая во внимание важность процессов гаметогенеза и начальных этапов эмбриогенеза в этиологии и патогенезе хромосомной патологии, в данном разделе будут рассмотрены: гаметогенез (сперматогенез и оогенез) и оплодотворение.

1.1.1. Гаметогенез

Все половые клетки млекопитающих и человека берут начало от первичных половых клеток (ППК) — гонцитов. Происхождение ППК до настоящего времени окончательно не выяснено. Не вызывает, однако, сомнения, что эти клетки возникают значительно раньше, чем появляются зачатки гонад, то есть они имеют экстрагонадное проис-

хождение. Согласно существующим представлениям ППК могут быть обнаружены в первичной полоске уже на 16–18-й день развития, затем они перемещаются в желточную (внезародышевую) энтодерму у основания аллантоиса, мигрируют в энтодерму средней кишки, откуда и попадают в половые валики — зачатки гонад [54, 56, 172]. В последнее время получены данные о том, что ППК выделяются в самостоятельный эмбриональный зачаток значительно раньше, еще во время дробления и формирования бластоцисты.

Попав в зачатки гонад, гоноциты впервые обнаруживают признаки полового диморфизма. При формировании мужских гонад (семенников) они окружаются клетками целомического эпителия, образуя так называемые «половые тяжи», в составе которых пребывают в латентном, недифференцированном состоянии (сперматогонии) вплоть до начала полового созревания.

При формировании женских гонад (яичников) гоноциты задерживаются в наружном, корковом слое мезенхимной ткани половых валиков, активно пролиферируют, вступают в мейоз, после чего каждый из них окружается фолликулярными клетками и, в виде ооцитов 1-го порядка, сохраняется до полового созревания. Принципиальная схема гаметогенеза у млекопитающих и человека приведена на рисунке 1.1.

1.1.1.1. Сперматогенез

Общая продолжительность сперматогенеза у человека составляет 72 дня. За это время стволовые клетки сперматогенного ряда (сперматогонии), находящиеся в глубине извитых семенных канальцев, проходят длительный путь дифференцировки до зрелых, практически лишенных цитоплазмы, сперматозоидов, содержащих гаплоидный набор хромосом. В процессе сперматогенеза различают две фазы — тестикулярную и эпидидемальную. Во время первой происходят основные этапы дифференцировки сперматогоний в сперматозоиды; во время второй завершается созревание спермиев. В результате накопления мукополисахаридов, холестерина, других защитных белков, меняются свойства наружных мембран, спермии приобретают подвижность.

Сперматогенез (тестикулярная фаза) включает два последовательных этапа: собственно сперматогенез и спермиогенез. Тестикулярная фаза контролируется гормонами гипофиза (фолликулостимулирующим



Рис. 1.1. Принципиальная схема сперматогенеза (слева) и оогенеза (справа) у млекопитающих и человека [895]

и лютеотропным) и собственными гормонами семенников — тестикулярными андрогенами (тестостероном, андростендионом и другими), которые продуцируются клетками Лейдига, находящимися в строме извитых семенных канальцев.

На 1-м этапе вступающие в мейоз клетки (сперматоциты 1-го порядка) претерпевают два последовательных мейотических деления. При этом из одного сперматоцита 1-го порядка возникают 4 клетки

(сперматиды) с гаплоидным числом хромосом (рис. 1.1). Все процессы дифференцировки проходят в стенке извитых семенных канальцев. При этом клетки сперматогенного ряда находятся непосредственно в цитоплазме клеток Сертоли, которые обеспечивают питание сперматоцитов и сперматид.

Во время спермиогенеза гаплоидные клетки — сперматиды — проходят ряд последовательных стадий дифференцировки (фаза Гольджи, фаза колпачка, акросомная фаза, фаза созревания). Они утрачивают цитоплазму, формируют специальные органоиды (хвост, шейку, акросому) (рис. 1.2). Акросома возникает непосредственно из мембран аппарата Гольджи, покрывает в виде колпачка переднюю часть головки спермия (примерно до ее середины) и содержит набор литических лизосомных ферментов, важных для оплодотворения (рис. 1.2).

Особенно существенные изменения происходят непосредственно в ядре клеток. ДНК в составе хромосом утрачивает типичную для соматических клеток нуклеосомную организацию. Гистоновые белки, характерные для функционально активной ДНК, заменяются на кис-

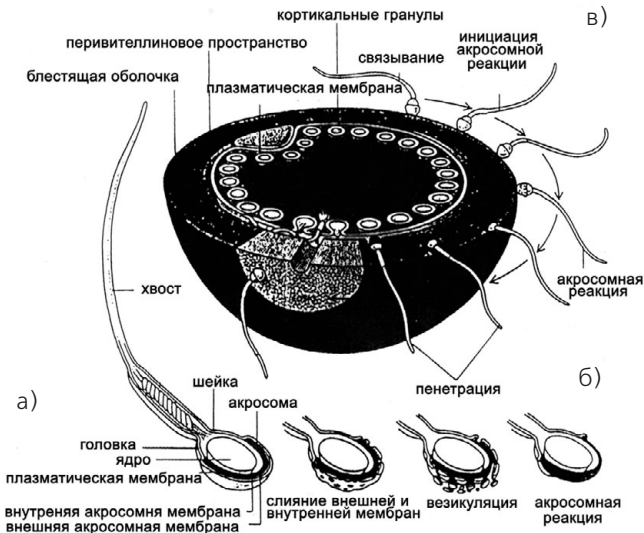


Рис. 1.2. Строение зрелого сперматозоида (а), акросомная реакция (б), последовательные этапы оплодотворения (в)

лые белки, богатые аргинином и протаминами. Спирализация ДНК достигает максимальной величины. Ежедневно у человека активного репродуктивного возраста продуцируется свыше 10 млн зрелых сперматозоидов.

1.1.1.2. Оогенез

В отличие от мужских половых клеток родоначальники женских половых клеток — оогонии — претерпевают важнейшие стадии дифференцировки, включая все этапы профазы мейоза (рис. 1.1), еще во внутриутробном периоде развития. Более подробно временные и цитогенетические характеристики мейоза у зародышей женского пола и у половозрелых женщин представлены на рисунке 1.3. Временные особенности основных периодов оогенеза у человека приведены в таблице 1.2. Достигнув зачатков будущих яичников (половых валиков) примерно к концу 1-го — середине 2-го месяца беременности, гоноциты теряют амебoidalную подвижность, вступают в контакт с клетками фолликулярного эпителия и преобразуются в оогонии. В течение пос-

Таблица 1.2. Временные особенности основных периодов оогенеза у разных млекопитающих и человека [52]

Объект	Вступление ооцитов в мейоз	Размножение оогониев	Рост ооцитов		Созревание ооцитов, часы
			Профаза мейоза	Диктиотена	
Человек	Асинхронное	2–5 м. б.	2,5–8 м. б.	8–9 м. б. — 13,5–14 лет	54–60
Макака	»	2–5 м. б.	2–6 м. б.	5 м. б. — 2–3 года	54–60
Мышь	Синхронное	10–14 д. б.	14–20 д. б.	2–3 д. п. р. — 1,5 м. п. р.	16–20
Крыса	»	14–17 д. б.	17,5 д. б. — 4 д. п. р.	5 д. п. р. — 1,5 м. п. р.	16–20
Кролик	»	14–20 д. п. р.	3–20 д. п. р.	20 д. п. р. — 4–5 м. п. р.	15–18
Золотистый хомячок	»	10–17 д. б.	1–9 д. п. р.	10 д. п. р. — 1,5 м. п. р.	16–20

Примечание. Периоды оогенеза даны в соответствующих стадиях онтогенеза: д. б. — дни беременности, д. п. р. — дни после рождения, м. б. — месяцы беременности, м. п. р. — месяцы после рождения

ледующих 3–4 месяцев оогонии активно делятся митозом. В результате их число возрастает от исходных 1500–2000 клеток до нескольких миллионов. Максимальное число оогоний (до 7 млн) находится в яичниках плодов женского пола на 7-м месяце беременности. Сразу же за периодом размножения следует апоптоз — запрограммированная гибель большей части оогониев. Причины апоптоза остаются невыясненными. Неясна и селективная роль такой массовой клеточной гибели. Возможно, погибают те оогонии, которые по тем или иным причинам не могут трансформироваться в ооциты и вступить в мейоз, либо, что кажется более правдоподобным, гибнущие клетки — это ооциты, находящиеся в профазе мейоза.

Количество женских половых клеток к концу беременности и у новорожденных уменьшается в среднем до 2 млн, к 7 годам — до 300 000, а к началу полового созревания — до 40 000. Реально в течение всей жизни овулирует не более 400–500 ооцитов. Значительная часть естественной убыли женских половых клеток происходит в результате апоптоза оогониев, другие погибают уже внутри атретических фолликулов, которые не доходят до овуляции. Уместно также отметить, что в отличие от млекопитающих, процессы оогенеза у человека протекают асинхронно, а потому значительно растянуты во времени.

Уже с 3-го месяца беременности часть оогониев завершает циклы митотических делений, трансформируется в ооциты и вступает в период роста. Они увеличиваются в размерах, окружаются фолликулярными клетками, вступают в профазу мейоза (рис. 1.3). Однако в отличие от мужского мейоза, в оогенезе вслед за профазой не наступает метафаза, а мейоз блокируется, и ооциты надолго, вплоть до начала полового созревания, переходят в состояние покоя — диктиотену. Предполагается, что блокада мейоза связана с действием особых факторов, секретируемых соматическими (фолликулярными) клетками гонады [54]. Окруженные одним слоем фолликулярных клеток ооциты образуют так называемые первичные (примордиальные) фолликулы. До полового созревания длится период медленного роста, во время которого прогрессивно увеличивается число слоев фолликулярных клеток, окружающих ооцит на стадии покоя (диктиотены). Ядро ооцита на этой стадии очень крупное, светлое, называется иногда «зародышевым пузырьком». Характерной структурой такого ядра у человека являются

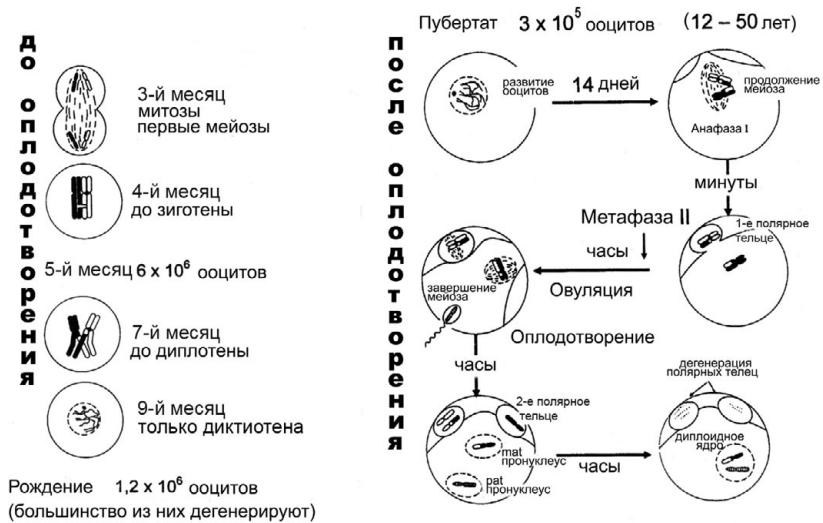


Рис. 1.3. Цитогенетические и временные характеристики профазы мейоза у плодов женского пола и стадий созревания яйцеклеток после полового созревания [804]

«ламповые щетки» — петли ДНК, на которых происходит активный синтез РНК-комплексов, откладывающихся в ооплазме до момента оплодотворения. Размеры ооцита по мере увеличения числа фолликулярных клеток также увеличиваются. Рост самого ооцита прекращается только с началом периода быстрого роста его фолликула, что совпадает с периодом полового созревания. В это время внутри фолликула образуется полость (антрум), которая заполняется жидкостью. Ее размеры быстро увеличиваются. Фолликул превращается в Граафов пузырь [52].

Созревание ооцитов начинается с возобновления мейоза и заканчивается только после оплодотворения, когда завершается 2-е мейотическое деление (рис. 1.3). С наступлением активного репродуктивного возраста ооциты группами (5–10 шт.) вступают в мейоз, однако в большинстве случаев в каждом цикле овулирует только один, наиболее продвинутый в развитии доминантный фолликул, тогда как ооциты

в остальных фолликулах, вступившие в период созревания, прекращают развитие и подвергаются атрезии.

Рост и созревание фолликулов с находящимися в них ооцитами находится под гормональным контролем как со стороны гипофиза (фолликулостимулирующий гормон — ФСГ, лютеотропный гормон — ЛГ) и гипоталамуса (пролактин — гонадотропин-релизинг гормон), так и самого яичника (эстрогены, гормоны фолликулярных клеток, прогестерон — гормон желтого тела). При этом период роста ооцитов, особенно период быстрого роста, контролируется преимущественно ФСГ, а период созревания — ЛГ. Примерно за сутки до овуляции, то есть до разрыва Граафова пузырька и выхода ооцита, отмечается пик подъема ЛГ.

Контролирующие механизмы оогенеза и особенности гормональной регуляции этого процесса подробно рассмотрены в ряде обстоятельных монографий и обзоров [52, 54, 94, 129, 556].

1.1.2. Оплодотворение

Кульминационным моментом зарождения новой жизни является встреча мужских и женских гамет.

Примерно через сутки после подъема в крови женщины уровня ЛГ отмечается набухание и разрыв «зародышевого пузырька» (ядра ооцита), возобновляется мейоз, отделяется 1-е полярное тельце. Во время овуляции происходит разрыв Граафова пузырька, и ооцит на стадии метафазы II, окруженный «лучистым венцом» (*corona radiata*) из гранулезных клеток яйценосного бугорка (*cumulus*), попадает в ампулярную часть яйцевода, где обычно и происходит оплодотворение. Собственные оболочки овулировавшей яйцеклетки представлены блестящей оболочкой (*zona pellucida*) и плазматической (вителлиновой) мембраной, непосредственно прилежащей к ооплазме (рис. 1.2, в). Блестящая оболочка имеет преимущественно мукополисахаридную природу и является продуктом как самого ооцита, так и питающих его фолликулярных клеток. Ее важной особенностью является наличие особых белков — гликопротеинов ZP1, ZP2 и ZP3, ответственных за видовую специфичность оплодотворения.

Овулировавший ооцит, безусловно, является самой крупной клет-

кой организма. Его диаметр без блестящей оболочки составляет 110–120 микрон, с блестящей оболочкой — 140–150 микрон.

Сперматозоиды приобретают способность к оплодотворению только после нескольких часов пребывания в половых путях женщины. Во время их продвижения по яйцеводам, происходит удаление с наружной плазматической мембраны защитных белков, мукополисахаридов (в том числе фактора декапацитации) и холестерина. В результате этих процессов, получивших название реакции капацитации, изменяется электрический заряд наружной мембраны, усиливается потребление кислорода, возрастает подвижность сперматозоидов. Капацитация *in vitro* может быть получена путем инкубации в течение нескольких часов отмытых от слизи сперматозоидов в солевом растворе при +37 °С.

Считается, что *in vivo* места оплодотворения в яйцеводе достигают только несколько сперматозоидов из общего числа 30–40 млн клеток в одном эякуляте. Сперматозоиды могут сохранять способность к оплодотворению в течение нескольких дней, а по некоторым наблюдениям — до 1 недели.

Основные биологические барьеры на пути проникновения спермия в овулировавшую яйцеклетку представлены клетками лучистого венца, блестящей (*zona pellucida*) и плазматической (вителлиновой) оболочками яйцеклетки (рис. 1.2, в).

Преодоление лучистого венца (*corona radiata*) достигается активным движением самого сперматозоида, а также за счет растворения и разжижения межклеточного мукополисахаридного матрикса гиалуронидазой, выделяемой акросомами погибших спермиев.

Пройдя через *corona radiata*, сперматозоид вначале неспецифически, а затем специфически связывается с поверхностью блестящей оболочки. Происходит так называемая «акросомная реакция»: в результате разрушения наружной акросомной мембраны спермия высвобождается набор литических ферментов (гиалуронидаза, акрозин, нейраминидаза), которые и обеспечивают пенетрацию блестящей оболочки (рис. 1.2, а, б). Общая продолжительность акросомной реакции составляет 10–15 минут. Естественно, что преодоление блестящей оболочки, являющейся наиболее серьезным естественным барьером, требует изначально наличия интактной нормальной акросомы. Сперматозоиды с неправильной формой головки или с

нарушенной акросомой не способны к естественному оплодотворению.

Пройдя через блестящую оболочку, сперматозоид связывается своей постакросомальной областью (экваториальным сегментом) с микрофиламентами вителлиновой оболочки и погружается внутрь ооплазмы путем пиноцитоза, то есть без разрушения целостности наружной мембраны яйцеклетки.

Присоединение сперматозоида к плазматической мембране сопровождается сложной ответной реакцией яйцеклетки, получившей название «кортикальной реакции», или «реакции активации». Подобно волне, она распространяется по поверхностному слою яйцеклетки от места проникновения первого сперматозоида. Ее начало знаменуется локальным повышением концентрации ионов Ca^{2+} , которое стимулирует распад находящихся в кортикальном слое ооплазмы лизосомоподобных структур — кортикальных гранул, содержимое которых (протеиназы, пероксидазы, нейраминидаза) быстро достигает сначала плазматической, а затем и блестящей оболочек. При этом происходит сокращение кортикального слоя ооплазмы, в результате между блестящей и плазматической оболочками появляется перивителлиновое пространство. В самой блестящей оболочке наблюдается быстрое разрушение рецепторных гликопротеинов ZP3, что делает невозможным прикрепление и проникновение в яйцеклетку других сперматозоидов (блок полиспермии). Реакция активации приводит к снятию мейотического блока, быстрому завершению яйцеклеткой 2-го деления созревания и отделению в перивителлиновое пространство 2-го полярного тельца. Головка спермия, попавшая в ооплазму в результате оплодотворения, и оставшийся после 2-го мейотического деления гаплоидный набор хромосом яйцеклетки трансформируются соответственно в мужской и женский пронуклеусы. Оплодотворение, продолжительность которого не превышает 24 часа, завершено. Начинается индивидуальное развитие нового организма.

1.2. Презэмбриональный период

Презэмбриональный период (первые 20 дней после оплодотворения) включает доимплантационные стадии, имплантацию и начало постимплантационного этапа развития.

1.2.1. Доимплантационный период (дробление, компактизация, бластуляция)

Доимплантационное развитие у человека занимает около 6–7 дней (1–6 д. р. /1 н. б.) и включает такие основные морфогенетические процессы как формирование пронуклеусов, дробление, компактизация и бластуляция. Фотографии зародышей человека доимплантационных стадий развития (от зиготы до бластоцисты) приведены на рисунке 1.4.

Собственно развитие зародыша начинается с формирования мужского и женского пронуклеусов. При этом мужской пронуклеус формируется несколько раньше женского (8 часов после оплодотворения). Деконденсация его хромосом выражена в большей степени, чем жен-

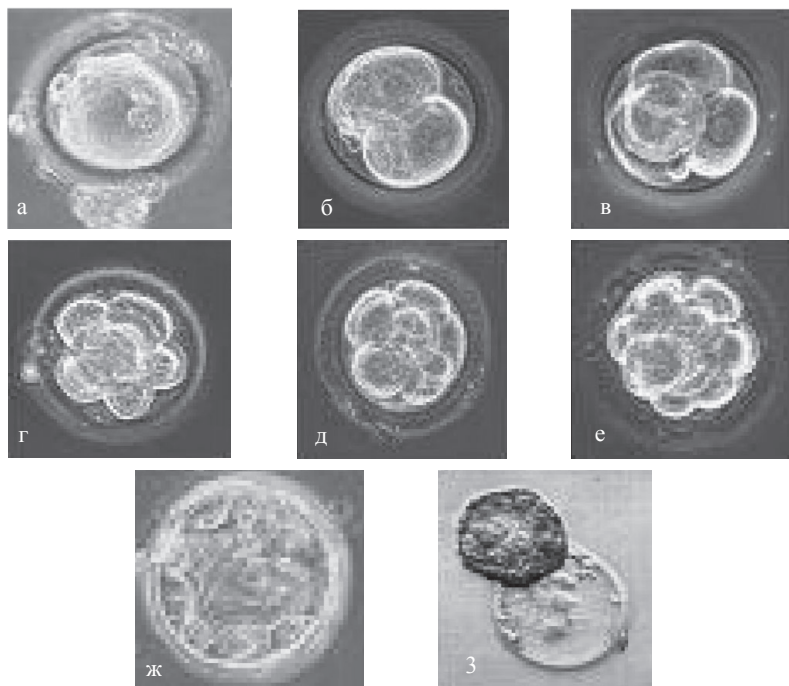


Рис. 1.4. Прижизненные фотографии зародышей человека доимплантационного периода развития. Фазовый контраст. а — зигота; б — 2 бластомера; в — 4 бластомера; г — 6 бластомеров; д, е — морула; ж — бластоциста; з — вылупление бластоцисты. Увеличение 200×. (Фотографии любезно предоставлены С. Mackie Ogilvie, Guy Hospital, London, и проф. В. С. Корсаком, НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург)

ского. В результате размеры мужского пронуклеуса несколько превосходят размеры женского. Формирование обоих пронуклеусов завершается через 12 часов после оплодотворения (рис. 1.5, а). Уже через 9 часов в обоих пронуклеусах начинается синтез ДНК, то есть происходит репликация хромосом. Через 20 часов оба пронуклеуса встречаются примерно в центре ооплазмы. Хромосомы конденсируются и приблизительно через 30 часов после оплодотворения, когда растворяются ядерные оболочки. Хромосомный материал обоих пронуклеусов объединяется в одной метафазной пластинке (сингамия). Наступает 1-е деление дробления. Дальнейшие деления дробления происходят примерно каждые 18 часов. Со стадии двух бластомеров отмечается асинхронность ритма дробления бластомеров. В течение трех первых делений дробления все бластомеры имеют округлую форму, идентичны по своей морфологии и ростовым потенциям.

На стадии морулы (3–5-й дни развития, рис. 1.4, д, е) зародыш состоит из 8–16 бластомеров, начинается процесс компактизации, сопровождающийся поляризацией бластомеров. При этом бластоте-

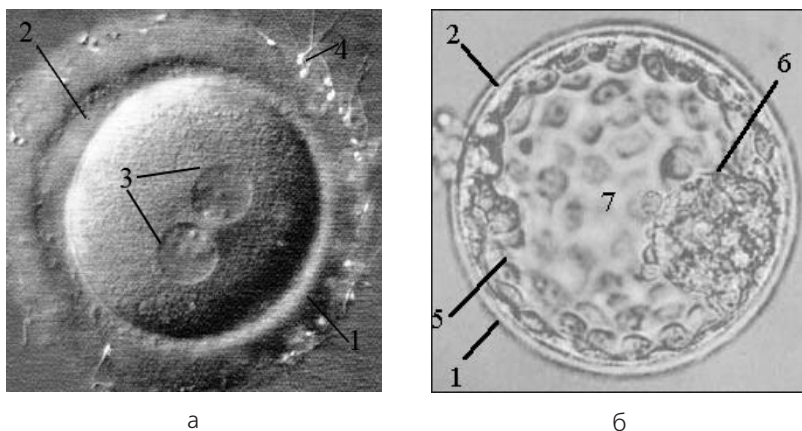


Рис. 1.5. Прижизненные фотографии зародышей человека на стадии зиготы (а) и на стадии бластоцисты (б). Обозначения: 1 — блестящая оболочка; 2 — перивителлиновое пространство; 3 — пронуклеусы; 4 — сперматозоиды; 5 — трофобласт; 6 — эмбриобласт (внутренняя клеточная масса); 7 — бластоцель. (Фотографии любезно предоставлены проф. В. С. Корсаком, НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург)

ры, расположенные снаружи, приобретают свойства эпителиальных клеток, между ними возникают тесные межклеточные контакты (десмосомы), а внутри зародыша начинает накапливаться жидкость.

Через 4,5–5 дней после оплодотворения зародыш превращается в бластоцисту — небольшой пузырек, заполненный жидкостью. Стенка бластоцисты состоит из одного слоя крупных клеток трофобласта, изнутри к которому в одном месте прилежит небольшая группа клеток эмбриобласта (внутренняя клеточная масса — ВКМ) (рис. 1.4; рис. 1.5, б). Общее число клеток на этой стадии — более 60.

Клетки трофобласта (трофэктодермы) начинают активно синтезировать гормон — хорионический гонадотропин (тест на беременность!), а также различные лизирующие ферменты, в результате чего приобретают инвазивные свойства, обеспечивая гистиотрофное питание зародыша и процесс имплантации.

Клетки ВКМ активно размножаются и при дальнейшем развитии дают начало всем тканям собственно эмбриона, а также его внезародышевым частям (хорион, плацента, желточный мешок, аллантоис, амнион).

В ходе дробления зародыш продвигается по маточной трубе в направлении матки как за счет тока жидкости, так и вследствие перистальтических сокращений мускулатуры и движения эпителиальных ресничек. На 5–6-й день зародыш на стадии бластоцисты попадает в матку.

В заключение отметим, что первые деления дробления осуществляются за счет генетической информации, накопленной ооцитом еще в период оогенеза. Зародыш человека обладает достаточным запасом готовых белков, рибонуклеопротеиновых комплексов, необходимых для синтеза новых белков, а также питательных веществ и энергетических ресурсов, чтобы полностью обеспечить начальные этапы эмбриогенеза. Синтез белков, необходимых на этой стадии, происходит на матрицах РНК, синтезированных еще в оогенезе, то есть на хромосомах ооцита. Отсюда ее название — материнская РНК. Переключение индивидуальной генетической программы с материнской РНК на геном самого зародыша происходит постепенно. Считается, что у зародыша человека этот процесс начинается только со стадии 4–8 бластомеров, то есть несколько позже, чем у лабораторных мышей (2 бластомера).

1.2.2. Имплантация и раннее постимплантационное развитие

Зародыши человека во время имплантации и в течение раннего постимплантационного периода по многим причинам малодоступны для прямого исследования. Отчасти это обусловлено тем, что в большинстве случаев женщина еще не знает о своей беременности. Отсутствуют безопасные для плода инвазивные методы прижизненного получения материала, а материал медицинских абортотворов крайне редко пригоден для морфологических исследований. Возможности применения прямого ультразвукового сканирования, даже с использованием УЗ-аппаратов высокого разрешения, не позволяют исследовать тонкую морфологию развивающегося зародыша ввиду его небольших размеров. Поэтому приведенные сведения основаны, главным образом, на результатах изучения уникальных случаев, данных сравнительной эмбриологии высших приматов и прямых визуальных наблюдениях, выполненных с помощью УЗ-аппарата уже в раннем постимплантационном периоде.

Достигнув матки, зародыш выходит из блестящей оболочки. Процесс «вылупления» (называемый также «хэтчингом») происходит как за счет активного движения (пульсации) самого зародыша, так и за счет действия литических ферментов, выделяемых клетками трофобласта (рис. 1.5, б). К моменту имплантации слизистая матки набухшая, находится в фазе секреции. Эпителий маточных желез выделяет гликоген, муцин, сиаловые кислоты, гистамин. Сильно развит децидуальный слой эндометрия, особенно в месте имплантации зародыша. Клетки трофобласта вступают в непосредственный контакт с клетками слизистой оболочки матки и с помощью литических ферментов разрушают вначале эпителий, а затем и несколько подлежащих слоев децидуальных клеток (рис. 1.6). Постепенно зародыш оказывается полностью погруженным в эндометрий стенки матки. Поэтому такой тип имплантации и называется интерстициальным. Продолжительность имплантации у человека от момента прикрепления плодного яйца к стенке матки до его полного погружения в эндометрий составляет около 40 часов.

Сам процесс имплантации требует строгой синхронизации программы развития зародыша и состояния стенки матки, регулируемой

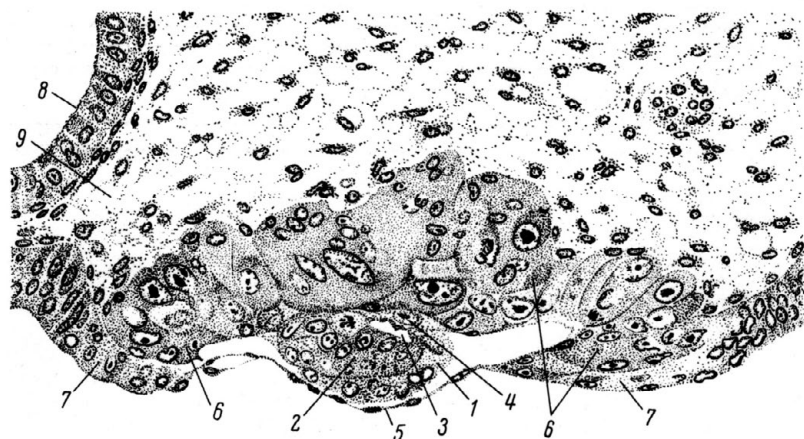


Рис. 1.6. Имплантирующаяся бластоциста человека 7,5 суток внутриутробного развития [458]: 1 — энтодерма; 2 — наружный слой зародышевого щитка (первичная эктодерма); 3 — амниотическая полость; 4 — трофэктодерма; 5 — внезародышевая энтодерма; 6 — разрастающийся трофобласт в слизистой матки; 7 — регенерирующий эпителий матки; 8 — маточная крипта; 9 — соединительная ткань матки

с помощью половых гормонов. Любые нарушения в самом зародыше или связанные с дефектами эндометрия, а также с десинхронизацией ритмов развития зародыша и стенки матки неминуемо ведут к нарушению имплантации и прерыванию беременности. Последнее может наступать столь рано, что зачастую не улавливается даже самой женщиной. Известный отечественный эмбриолог профессор П. Г. Светлов связывал первый критический период развития зародыша человека именно с процессом имплантации [170].

Для эмбриогенеза человека характерно очень раннее обособление провизорных органов. Уже во время имплантации возникает внезародышевая мезодерма, выстилающая полость бластоцисты и участвующая в образовании хориона. Многочисленные ворсинки хориона покрывают поверхность плодного яйца и глубоко проникают в толщу стенки, разрушая сосуды эндометрия. Это ведет к появлению лакун с материнской кровью, в которых плавают трофобластические тяжи, образующие первичные ворсинки. С их появлением

зародыш называют плодным пузырем. Вростание в трофобластические тяжи внезародышевой мезодермы приводит к образованию вторичных ворсин (13–14 д. р.). Клетки наружного слоя трофобласта образуют синцитий. Внутренний слой представлен камбиальными клетками цитотрофобласта (клетки Лангханса). Именно эти клетки, длительное время сохраняющие митотическую активность, используются для цитогенетического анализа при необходимости кариотипировать зародыш (см. главу 4).

У человека, таким образом, развитие хориона существенно опережает развитие производных эмбриобласта. Более того, до определенной степени оно не зависит от развития самого зародыша. Хорошо известно, что ворсинки хориона могут оставаться в матке жизнеспособными в течение нескольких недель после резорбции самого зародыша [53]. Анализ таких абортивных плодных пузырей, зачастую лишенных зародышей или содержащих их мацерированные остатки (*blighted ova*), до недавнего времени служил источником информации о влиянии хромосомного дисбаланса на эмбриогенез человека. Именно на этих ранних стадиях развития дефекты наследственного аппарата, в том числе и хромосомные аномалии, приводят к гибели зародышей, которая нередко воспринимается женщинами как нарушение ритма менструального цикла.

Во время имплантации и раннего постимплантационного периода происходят кардинальные события и в самом зародыше. Этапы развития и дифференцировки зародыша человека на ранних стадиях развития приведены на схеме (рис. 1.7).

Путем деляминации (расслоения) внутренней клеточной массы на эктодерму и энтодерму вначале образуется двухслойный, а затем, после формирования первичной полоски и Гензеновского узелка, и трехслойный (появляется зародышевая мезодерма) зародыш, возникают желточный мешок и амнион, соответственно, появляются амниотическая полость и полость желточного мешка (рис. 1.8, а). Из заднего конца крыши желточного мешка вырастает в амниотическую ножку продолговатый, слепо оканчивающийся вырост — аллантаоис. Вместе с окружающей его мезенхимой и вырастающими на более поздних стадиях эмбриогенеза сосудами, он принимает участие в формировании пуповины. Зародыш человека во время имплантации показан на рисунке 1.8, б.

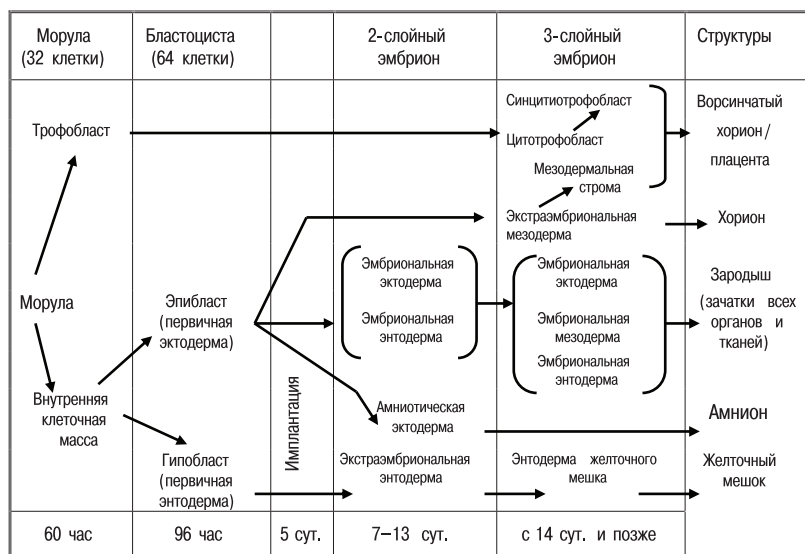


Рис. 1.7. Схема развития и дифференцировки эмбриона человека на ранних стадиях развития [54, 337]

На 9–14-е сутки зародыш человека представлен мощно развитыми внезародышевыми частями (трофобласт, внезародышевая мезенхима, амнион, желточный мешок, амниотическая ножка), и лишь его ничтожная часть (дно амниотического пузыря и крыша желточного пузырька) представляет собой материал, из которого позднее формируется тело зародыша. Основные морфологические характеристики зародыша человека в течение преэмбрионального периода развития приведены в таблице 1.1.

Отметим, что согласно классическим данным Института Карнеги, дополненным исследованиями чешского эмбриолога Ю. Ярасика [524], формирование первичной полоски происходит на 15–17-й д. р., главный осевой орган будущего скелета — хорда — закладывается на 17–20-й д. р., тогда же возникает и зачаток будущей центральной нервной системы — нервная пластинка 9 (рис. 1.9, а, б).

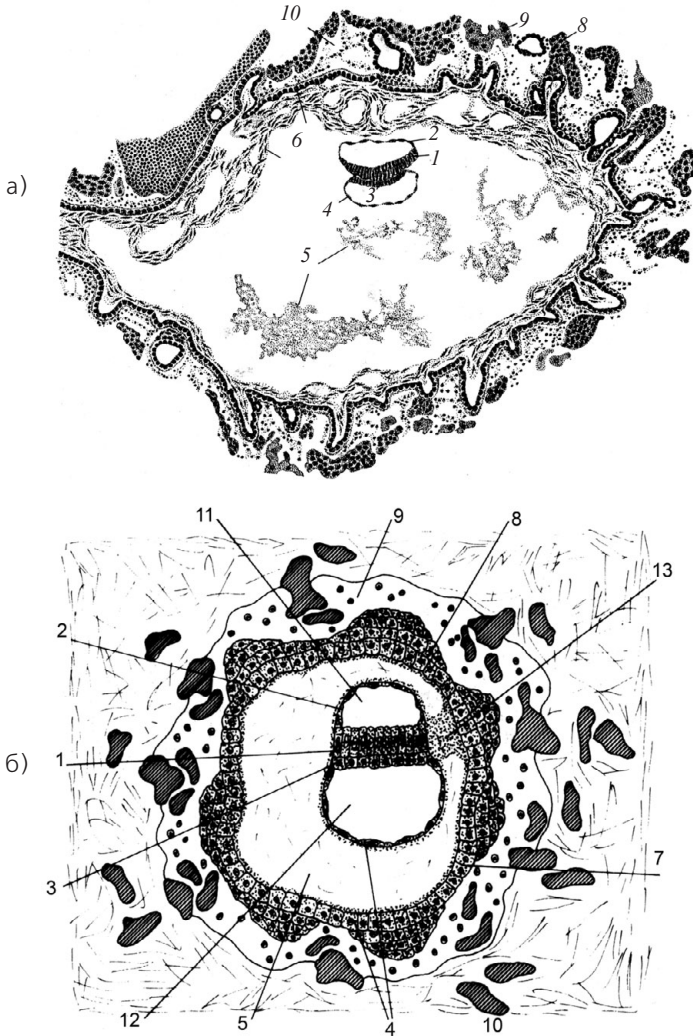


Рис. 1.8. Имплантирующийся зародыш человека 14-го (а) и 15-го (б) дней развития [80]: 1 — первичная эктодерма (наружный слой зародышевого щитка, дно амниотической полости); 2 — эктодерма амниона; 3 — эмбриональная энтодерма (внутренний слой зародышевого щитка, крыша желточного мешка); 4 — желточная энтодерма; 5 — экзоцелом; 6 — внезародышевая мезодерма; 7, 8 — цитотрофобласт; 9 — плазмодитрофобласт; 10 — лакуны с материнской кровью; 11 — амниотическая полость; 12 — полость желточного мешка; 13 — амниотическая ножка (зачаток аллантоиса)

1.3. Эмбриональный период

Эмбриональный этап развития (20–60 д. р./5–12 н. б.) включает периоды раннего (активного) и позднего органогенеза. Согласно понятиям классической эмбриологии, начало эмбрионального периода соответствует стадии нейруляции, то есть появлению нервной пластинки и закладке осевого комплекса органов. В это время происходит обособление зародыша от его внезародышевых частей (1), образование нервных валиков и их смыкание в нервную трубку (2), появляются первые сомиты, начинается сегментация и дифференцировка осевой мезодермы (3) (рис. 1.9, 1.10). Подробно эти сложные морфогенетические процессы рассмотрены в специальных монографиях и обзорах по эмбриологии и тератологии человека [26, 49, 80, 160, 524, 785].

Копчиково-тазовые размеры зародыша в течение этого периода увеличиваются от 1,5–2 до 30–40 мм. Временные параметры появления различных органов и некоторые их характеристики приведены в таблице 1.1. Внешний вид зародышей человека на последовательных стадиях развития согласно классификации Карнеги приведен на рисунке 1.11.

Четкими критериями начала этого периода являются появление первых сомитов и наличие нервного желобка, которые выявляются с помощью УЗ-аппарата. Уже на X стадии развития (21–26-й дни после овуляции/5–6-я н. б.) определяются 1–12 пар сомитов. Их число быстро нарастает и уже к XII стадии (28–32 д. п. о./6–8 н. б.) достигает 21–29 пар, а размеры плодного яйца составляют 3–5 мм. К 30-му д. п. о. насчитывается 30 пар сомитов, а у 7–8-недельного зародыша их становится 43–44 пары. В среднем в сутки прибавляется по 2–3 сомита. Сегментация (метамеризация) сомитов происходит постепенно, в направлении спереди — назад, начиная с 3-й пары. Решающая роль в сегментации и возникновении первичной метамерии тела принадлежит особому семейству генов — факторов транскрипции, получивших название гомеобоксных генов [84].

Из центральных крупных частей сомитов — миотомов — развивается вся скелетная мускулатура тела, тогда как из их более рыхлых парных периферических участков — боковых пластинок (спланхнотомов) — зачатки канальцев первичной (нефротомы), а также вторичной почки; эпителиальные выстилки брюшной, плевральной и перикардиальной полостей, вся гладкая мускулатура и зачаток сердца. Из других частей сомитов —

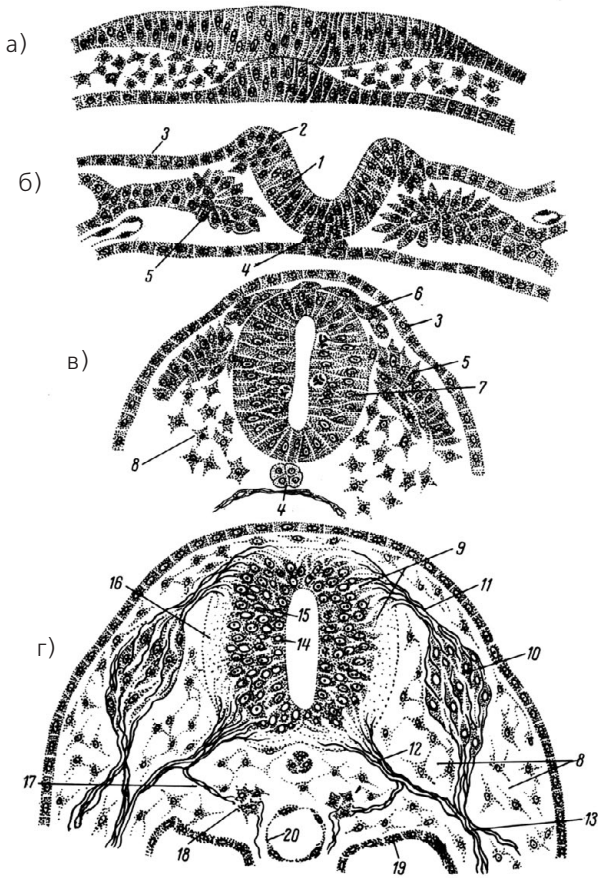


Рис. 1.9. Последовательные поперечные срезы зародышей человека на 8-й (а, б), IX (в) и X (г) стадиях развития. Формирование и дифференцировка нервной трубки и ганглиозной пластинки [80]: а — нервный желобок и нервные валики; б — замыкание желобка в трубку и срастание нервных валиков; в — нервная трубка, ганглиозная пластинка с выселяющимися клетками; г — начало дифференцировки спинного мозга и формирования спинальных ганглиев. 1 — нервный желобок; 2 — нервные валики; 3 — кожная эктодерма; 4 — хорда; 5 — мезодерма (сомиты); 6 — ганглиозная пластинка; 7 — нервная трубка; 8 — мезенхима; 9 — зачаток спинного мозга; 10 — зачаток спинального ганглия; 11, 12 — корешки спинномозговых нервов; 13 — смешанный нерв; 14 — эпендимный слой; 15 — плащевой слой; 16 — краевая вуаль; 17 — белая соединительная ткань; 18 — зачаток ганглия пограничного ствола; 19 — эпителий целома; 20 — аорта

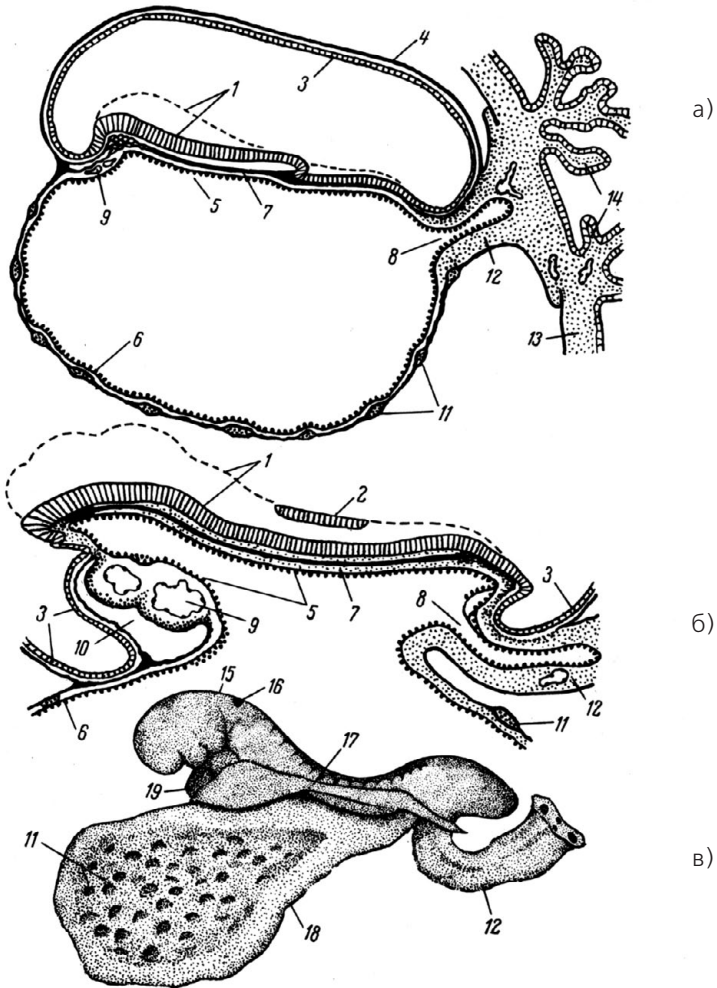


Рис. 1.10. Схема обособления зародыша от внезародышевых частей (а — стадия 8; б — стадия IX) и ранних этапов формирования сердечно-сосудистой системы (в — стадия XI). Сагиттальные срезы, хорион и амнион удалены [80]: 1 — кожная эктодерма; 2 — нервные валики; 3 — эктодерма амниона; 4 — мезодерма амниона; 5 — кишечная энтодерма; 6 — желточная энтодерма; 7 — хорда; 8 — аллантоис; 9 — эндотелиальный зачаток сердца; 10 — перикардальная полость; 11 — кровяные островки в стенке желточного мешка; 12 — амниотическая ножка; 13 — хориальная пластинка; 14 — ворсинка хориона; 15 — мандибулярные жаберные дуги; 16 — слуховая ямка; 17 — амнион; 18 — желточный мешок; 19 — сердечный выступ

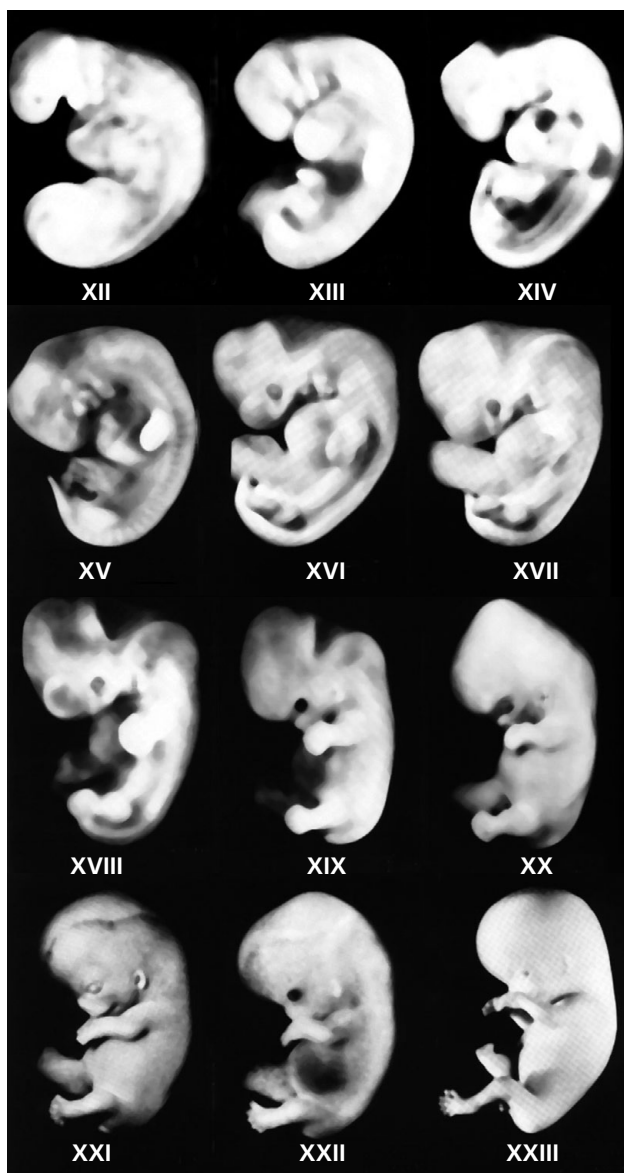


Рис. 1.11. Внешний вид зародышей человека на XII–XXIII стадиях развития по классификации Карнеги [383]

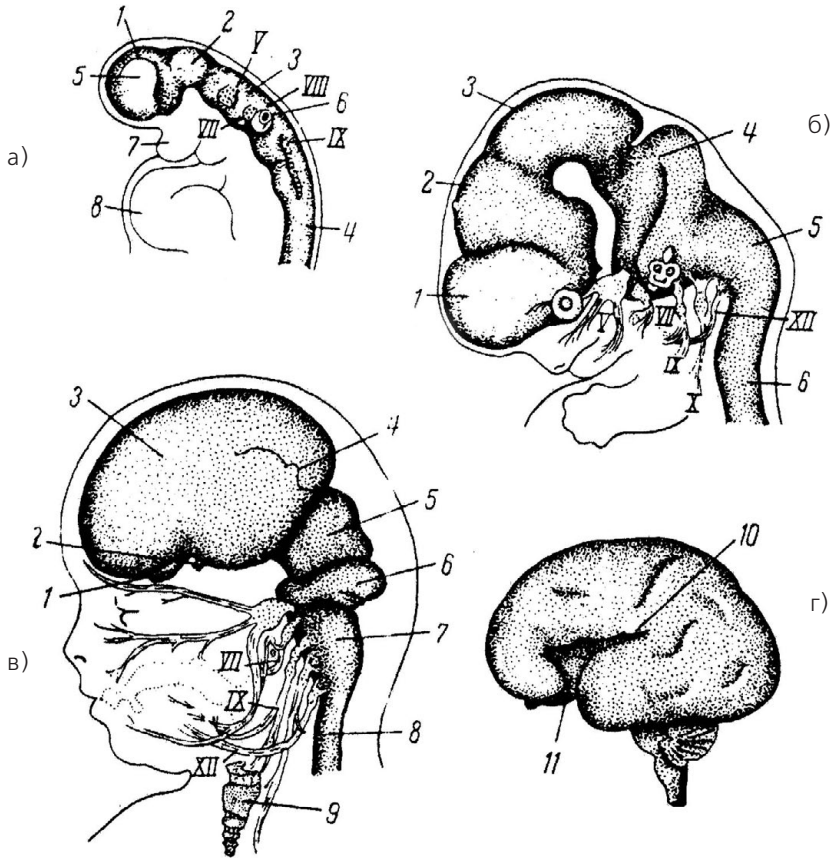


Рис. 1.12. Последовательные стадии развития головного мозга [159]: а — стадия трех мозговых пузырей (XII–XIII); 1 — prosencephalon; 2 — mesencephalon; 3 — rhombencephalon; 4 — спинной мозг; 5 — глазной пузырь; 6 — слуховая ямка; 7 — нижнечелюстной отросток; 8 — сердце; б — стадия пяти мозговых пузырей (V, VII, VIII, IX); 1 — telencephalon; 2 — diencephalon; 3 — mesencephalon; 4 — metencephalon; 5 — myelencephalon; 6 — спинной мозг; V, VII, IX, X, XII — черепно-мозговые нервы. в, г — формирование definitivoных отношений отделов головного мозга (фетальный период); 1 — обонятельная доля; 2 — перекрест зрительных нервов (*chiasma opticus*); 3 — полушария большого мозга; 4 — контур промежуточного мозга; 5 — средний мозг; 6 — мозжечок; 7 — продолговатый мозг; 8 — спинной мозг; 9 — гортань; 10 — Sylvian борозда; 11 — Рейлиев островок на дне Sylvian ямки; VII, IX, XII — черепно-мозговые нервы

склеротом (медиовентральная часть) и дерматом (дорсо-латеральная часть) развиваются соответственно осевой скелет и кожа.

Смыкание нервной трубки начинается в будущей шейной области зародыша и постепенно распространяется в каудальном и краниальном направлениях. На 6-й н. б. нервная трубка полностью закрыта. Уже после закрытия переднего и заднего нейропортов (отверстий нервной трубки) ее головной конец образует расширения, отделенные друг от друга перегородками, — мозговые пузыри. Вначале (XI горизонт Стритера) их три, затем передний и задний подразделяются каждый на два. Возникают пять мозговых пузырей (XIV горизонт Стритера, 35–38 д. п. о. / 9–10 н. б., размеры плодного яйца 11–13 мм). Первый из них дает начало большому (конечному) мозгу, второй — промежуточному, третий — среднему, четвертый — мозжечку и варолиевому мосту, пятый — продолговатому мозгу (рис. 1.12). Второй мозговой пузырь образует два парных выроста — зачатки глаз. Глазные пузыри появляются уже на XI стадии развития (табл. 1.1). Важная роль в дифференцировке мозговых пузырей и в дальнейшем становлении и развитии мозга и черепа принадлежит другой группе гомеобоксных генов — генам SOX.

На той же XI стадии в области промежуточного мозга возникают парные впячивания — слуховые плакоды (зачатки внутреннего уха). По бокам задней части головы и шеи зародыша, также в виде парных впячиваний эктодермы, возникают последовательно четыре пары жаберных щелей. Навстречу им в виде выпячиваний стенки передней кишки образуются четыре жаберных кармана. Прорывов жаберных карманов в соответствующие им жаберные щели у человека не происходит. Первая пара дает начало наружному уху, вторая (вместе с жаберным карманом) — среднему уху, остальные — эндокринным железам: тимусу, щитовидной и паращитовидной железам.

Важным событием в начале активного органогенеза является закладка магистральных сосудов и зачатка сердца. Сердце закладывается вначале как два крупных магистральных сосуда, которые затем сливаются, образуя единую трубку эндокарда, окруженную более толстым слоем миокарда — производного висцерального листка спланхнотомы и зародышевой мезенхимы. Сокращения сердца наступают еще до его иннервации, то есть способность к сокращению и проведению импульса присуща самой мезодерме. Первые сердцебиения регистрируются

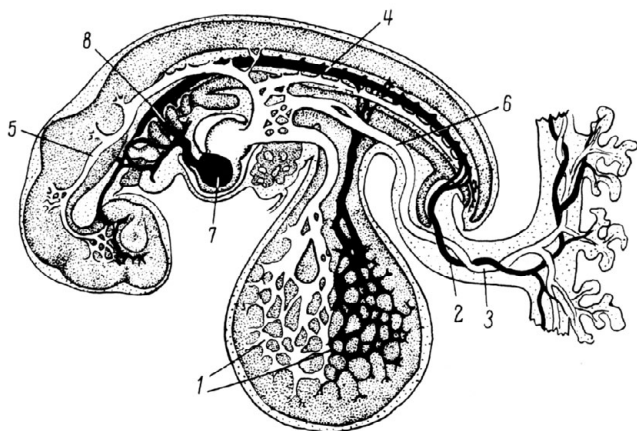


Рис. 1.13. Схема сосудистой системы зародыша человека XII стадии развития [80]: 1 — сосуды желточного мешка; 2 — пупочная артерия в амниотической ножке; 3 — пупочная вена; 4 — дорсальная аорта; 5 — передняя и 6 — задняя кардиальные вены; 7 — сердце; 8 — третья артериальная жаберная дуга

уже на 6-й н. б., точнее на стадии, соответствующей X горизонту Стритера (21–26 д. п. о. / 5–6 н. б., размеры плодного яйца 1,5–4 мм). Вместе с прилежащим зачатком печени сердце образует сердечно-печеночный выступ, сильно выпячивающийся в передней части вентральной стенки зародыша (рис. 1.10, в). Одновременно формируются крупные магистральные сосуды (дорсальная аорта, кардиальная вена), которые через амниотическую ножку вместе с аллантоисом подрастают к мезенхимному слою хориона, активно васкуляризируют его, принимая участие в формировании плодной части плаценты (см. ниже). На тех же X–XI стадиях (табл. 1.1) в мезодермальном слое желточного мешка появляются первые кровяные островки, формируются сосуды и начинается внутрисосудистое кроветворение; устанавливается замкнутое кровообращение через желточный мешок с магистральными сосудами зародыша. В период между 21-м (X стадия) и 32-м (XIII стадия) днями развития после овуляции завершаются ранние стадии развития сердца и устанавливается однонаправленный ток крови (рис. 1.13).

Печень и поджелудочная железа возникают в виде выростов энтодермальной стенки первичной кишки уже на X стадии развития (рис. 1.13). Печень характеризуется очень быстрым развитием, так как

играет важную роль в кроветворении, постепенно замещая в этой функции рано редуцирующийся желточный мешок.

Зачатки легких возникают на XII стадии (28 д. п. о. / 6–8 н. б.) в виде парного выпячивания вентро-каудального отдела кишечной трубки.

Особенно сложный, многоэтапный процесс эмбриогенеза, претерпевает почка. На X стадии она закладывается в виде рудиментарной (нефункционирующей) предпочки (pronephros) с ее отводящим протоком — Мюллеровским каналом (зачаток матки и маточных труб) [80, 81]. На стадии XI возникает первичная почка (mesonephros, или Вольфово тело), функционирующая как орган выделения в течение антенатального периода. Развиваясь из нефротомов сомитов (см. выше), первичная почка сохраняет метамерное строение. Ее отводящий проток — Вольфов канал — впоследствии трансформируется в семявыносящие протоки. Вольфовы и Мюллеровы каналы открываются в клоаку независимыми друг от друга отверстиями. При этом Вольфовы каналы остаются отдельными, а отходящие от них в область клоаки слепые отростки дают начало мочеточникам и лоханкам (см. ниже). Мюллеровы протоки в месте впадения в клоаку сливаются в один непарный канал. При этом изначально Мюллеров канал не связан с почечными канальцами, то есть не служит для оттока мочи, поэтому на переднем своем конце он начинается слепым расширением [80, 81].

Вторичная (окончательная) почка формируется из метанефрогенной ткани несегментированных каудальных участков нефротомов (см. выше), в которой уже на XII стадии (28 д. п. о. / 6–8 н. б.) дифференцируются почечные канальцы, вступающие одним концом в тесный контакт с врастающими в зачаток почечными артериями. Так возникают мальпигиевы тельца (клубочки). Другим концом они соединяются с парными отростками Вольфовых каналов, образующими мочеточники и почечные лоханки.

Зачатки гонад возникают в виде парных валиков овальной формы на медиальной стороне Вольфовых тел (первичных почек). Вначале (X–XI стадии) они не дифференцированы, однако после того как их достигают первичные половые клетки (ППК), мигрирующие из желточного мешка [172], начинается выраженная половая дифференцировка зачатков гонад, определяемая на гистологических препаратах начиная с XIV–XV стадий развития (35–43 д. п. о. / 8–10 н. б.). Важная роль в развитии внутренних половых органов, а впоследствии и наружных

гениталий, принадлежит производным Вольфовых и Мюллеровых каналов [80, 81].

У зародышей женского пола Вольфово тело и Вольфов канал редуцируются. Напротив, Мюллеровы каналы прогрессивно развиваются, причем его парные части становятся яйцеводами, а непарный, каудальный, отдел дает начало эпителию матки и влагалища.

При развитии зародыша мужского пола, наоборот, редуцируются производные Мюллера канала, тогда как Вольфовы каналы и Вольфовы тела преобразуются в семявыносящие пути.

Некоторые генетические аспекты половой дифференцировки будут рассмотрены нами в главе 2.

Среди других важных морфогенетических процессов, происходящих в период активного органогенеза, следует отметить образование почек конечностей. Сначала передних (27–28 д. п. о. / 6–8 н. б. — XII горизонт Стритера), затем задних (29–30 д. п. о. / 8–10 н. б. — XIII горизонт Стритера), рост и формирование кишечника с образованием естественной грыжи (37–42 д. п. о. / 11–12 н. б. — XVI горизонт Стритера), формирование глаз и уха, лицевого черепа, твердого неба и пр. (табл. 1.1).

Важнейшим событием этого периода является формирование плаценты. Процесс начинается с 3-й недели беременности и характеризуется бурным развитием ворсин хориона в месте врастания через амниотическую ножку (будущую пуповину) сосудов плода в мезенхимную часть хориальной оболочки. В формировании сосудистой сети плаценты принимают также участие сосуды, возникающие непосредственно за счет размножения и дифференцировки ангиобластов в мезенхиме хориона. При соединении пупочных сосудов с сосудистой сетью ангиобластов устанавливается плодово-плацентарный кровоток. Кровеносные сосуды врастают в соединительнотканый остов вторичных ворсинок хориона (рис. 1.14), превращая их, таким образом, в definitive третичные ворсинки (5–7 н. б.). В области формирования плаценты (участок стенки матки между зародышевым пузырем и миометрием — *decidua basalis*) ворсинки хориона растут особенно сильно, активно ветвятся. Синцитий ворсин омывается материнской кровью, изливающейся в межворсинчатое пространство из спиральных артерий и кровеносных лакун эндометрия. Схема строения плаценты человека приведена на рисунке 1.15. Сильно утолщенная *decidua basalis*, про-

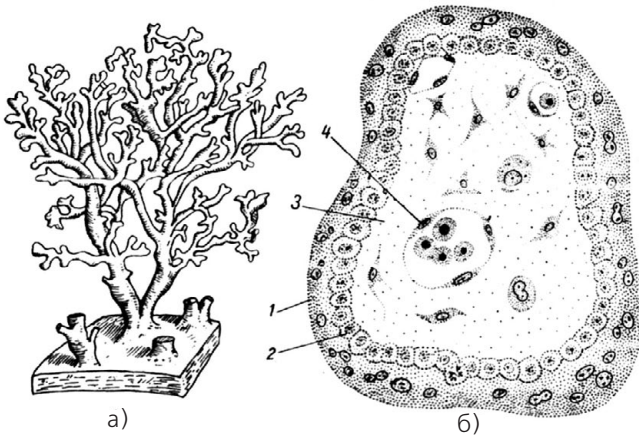


Рис. 1.14. Общий вид (а) и поперечный срез (б) definitivoй (третьичной) ворсинки хориона плода человека XX стадии развития [80]: 1 — плазмодиотрофобласт (синцитиотрофобласт); 2 — цитотрофобласт; 3 — соединительная ткань; 4 — кровеносный сосуд

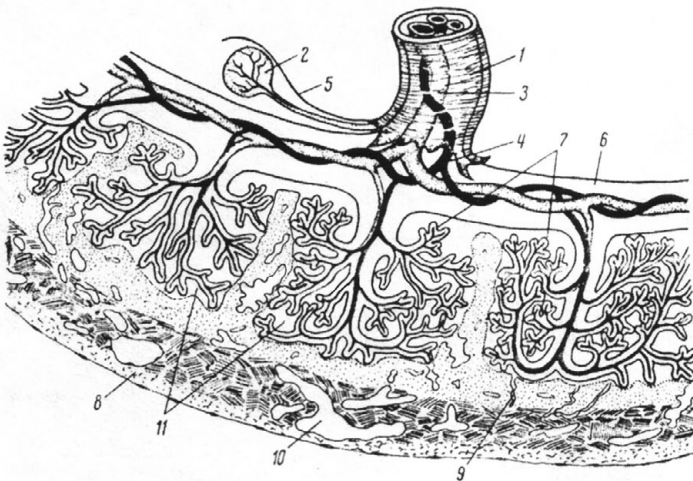


Рис. 1.15. Схема строения плаценты человека [80]: 1 — пупочный канатик; 2 — желточный мешок; 3 — пупочная артерия; 4 — пупочная вена; 5 — амнион; 6 — хорион; 7 — ворсинки хориона; 8 — стенка матки; 9, 10 — материнские сосуды (9 — артерии, 10 — вены); 11 — кровеносные лакуны

низанная ворсинками хориона, образует плодную часть дефинитивной хорион-аллантаидной плаценты. В области формирующейся плаценты пролиферативная активность цитотрофобласта особенно высока, поэтому такие ворсины особенно информативны для биопсии с целью получения хромосомных препаратов. Напротив, ворсины периферических по отношению к формирующемуся плацентарному диску частей хориона, прилежащих к области париетальной маточной стенки (*decidua parietalis*) уже со 2-го месяца беременности начинают постепенно атрофироваться и практически полностью отмирают к 3-му месяцу беременности (рис. 1.16). Период плацентации заканчивается с установлением плодово-плацентарного кровотока к концу 13-й н. б. [1].

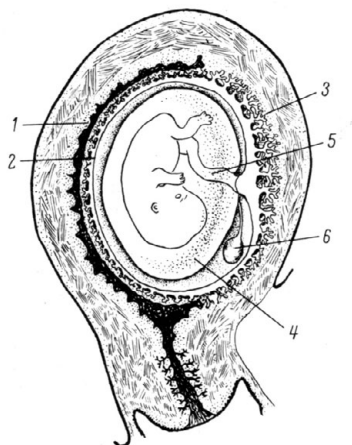


Рис. 1.16. Схема взаимоотношений плода (XVII–XVIII стадии развития) и материнского организма [80]: 1 — *decidua parietalis*; 2 — *decidua capsularis*; 3 — *decidua basalis*; 4 — амнион; 5 — пупочный канатик; 6 — желточный мешок

Таким образом, период раннего (активного) органогенеза (20–60 д. р. / 5–12 н. б.) знаменуется рядом кардинальных событий в эмбриогенезе человека: завершением процессов перемещения клеточных слоев (нейруляция); закладкой осевого комплекса (хорда, нервная трубка, сомиты); выделением и формированием зачатков практически всех органов и систем; формированием дефинитивной хорион-аллантаидной плаценты. Естественно, что столь существенные процессы морфогенеза требуют адекватной морфогенетической активности все-

го наследственного аппарата зародыша. Можно предполагать *a priori*, что в этот период зародыш человека будет обладать повышенной чувствительностью и к повреждающему действию разнообразных вредных внешних факторов — тератогенов. Действительно, богатый тератологический опыт классических исследований на лабораторных животных, экстраполированный на человека, а также данные клинического акушерства позволили проф. П. Г. Светлову выделить период плацентации и активного органогенеза во 2-й критический период развития у человека [170]. Именно в этот период зародыш человека проявляет особенно высокую чувствительность к повреждающим воздействиям эндогенной (наследственной) и экзогенной (тератогены) природы. В отличие, однако, от 1-го критического периода, где доминирует гибель эмбриона (рис. 1.4), реализуемые на этом сроке повреждения значительно чаще приводят к тяжелым множественным нарушениям отдельных органов и систем и к тяжелым анатомическим порокам. Более того, согласно теории критических периодов П. Г. Светлова, в развитии любого эмбрионального зачатка имеется свой критический период. При этом критические периоды закладки и дифференцировки различных органов и систем не совпадают. Поэтому, в зависимости от стадии эмбрионального развития, природы повреждающего агента, его дозы и длительности действия характер наблюдаемых аномалий может существенно варьировать. В настоящее время известно, что любому акту морфогенеза действительно предшествует период репрограммирования работы генома клеток будущего эмбрионального зачатка, и именно этот этап реализации генетической информации, по-видимому, и соответствует критическому периоду морфогенеза того или иного органа. В дальнейшем мы еще будем неоднократно возвращаться к проблеме критических периодов. Отметим только, что опыты по химическому тератогенезу далеко не всегда подтверждают теорию критических периодов, что, скорее всего, отражает высокую специфичность действия химических препаратов на процессы клеточного метаболизма и межклеточного взаимодействия. Поэтому весьма справедливым и практически важным является вывод о том, что зародыш человека следует максимально оберегать от неблагоприятных внешних воздействий и, особенно, от различных лекарственных препаратов на протяжении всего антенатального периода [51].

1.4. Плодный период

Без четкой границы события органогенеза, происходящие преимущественно в эмбриональный период, переходят в плодный (фетальный) период, когда основными в морфогенезе становятся процессы гистогенеза (табл. 1.1). Справедливости ради следует отметить, что дифференцировка клеточного и тканевого материала эмбриональных зачатков протекает параллельно с процессами органогенеза. При этом дифференцировка клеточного материала проходит два основных этапа.

1. Неспецифическая дифференцировка, когда клетки различных зачатков отличаются друг от друга какими-то общими морфологическими признаками (форма, количество и тип органоидов, взаиморасположение).

2. Специфическая (тканевая, или терминальная) дифференцировка — морфологическая, биохимическая и функциональная специализация клеток [80, 81].

Каждый эмбриональный зачаток в норме дает начало определенной совокупности тканевых производных. Какие ткани формируют тот или иной эмбриональный зачаток, каким образом в течение фетального периода осуществляется клеточная дифференцировка, как образуются дефинитивные, готовые к постнатальной жизни органы и ткани — все это подробно рассмотрено в прекрасном руководстве по эмбриональному гистогенезу академика А. Г. Кнорре [81].

Отметим только, что каждый эмбриональный зачаток, сформировавшийся в период органогенеза, имеет свое перспективное значение, дает много других производных, причем в процессе реализации своих перспективных потенциалов каждое производное проходит свойственные только ему этапы детерминации, дифференцировки и роста. При неблагоприятных внешних воздействиях (тератогены) или при искажении генетической программы индивидуального развития вследствие мутаций могут возникать нарушения, приводящие не только к видимым аномалиям, но, что особенно важно, к стойким биохимическим или физиологическим отклонениям, существенно нарушающим постнатальное развитие новорожденного. Так, воздействия в плодном периоде могут быть причиной нарушений развития нервной или репродуктивной систем, стойких эндокринных расстройств, то есть дефектов именно тех органов, процессы терминальной дифференцировки кото-

рых растянуты во времени и не завершаются на момент рождения ребенка. Из этого следует, что развивающийся зародыш человека реально чувствителен к повреждающему действию экзогенных и эндогенных факторов в течение всего антенатального периода развития, хотя конечный результат таких воздействий на разных стадиях эмбриогенеза может быть совершенно различным.

Заключение

В настоящее время накоплена обширная информация о проэмбриональном и внутриутробном (эмбриональном и плодном) периодах развития человека. Вместе с тем, некоторые вопросы эмбриогенеза человека все еще остаются неизученными. В частности, неясен механизм формирования желточного мешка, до конца не выяснен генез первичных половых клеток, достаточно скудна информация о морфогенетических процессах, происходящих в период нейруляции и закладки осевого комплекса органов, то есть на тех стадиях, когда эмбрионы человека малодоступны для прямого исследования. Вместе с тем, бурное развитие вспомогательных репродуктивных технологий позволило достаточно детально изучить особенности доимплантационного развития человека. Методы пренатальной диагностики позволяют получать материал плода человека практически на любом сроке беременности и, таким образом, существенно расширяют возможности для более детального анализа процессов раннего эмбриогенеза человека с помощью современных молекулярных и цитогенетических методов исследования.

ГЛАВА 2 НОРМАЛЬНЫЙ КАРИОТИП ЧЕЛОВЕКА

Введение

Термином «кариотип» принято обозначать совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора, свойственного клеткам одного организма данного вида. Видоспецифичность кариотипа определяется общим числом хромосом, их морфологическими особенностями (размерами и формой), а также их структурно-функциональной организацией, выявляемой с помощью методов дифференциальной окраски.

Собственно под кариотипом понимают хромосомы соматической клетки на стадии клеточного деления — метафазы митоза, на которой проводят анализ числа и структуры хромосом всего хромосомного набора (рис. 2.1, а; 2.2, а). Вместе с тем, для хромосомного анализа разработано множество методов, суть которых в широком смысле — изучение структуры и функции хромосом в клетках практически любых тканей и органов, на любой стадии клеточного цикла, в митозе и мейозе.

Очевидно, что выбор того или иного цитогенетического метода определяется конкретной целью исследования, однако в любом случае он состоит из двух этапов — получения хромосомных препаратов и собственно их анализа. В практическом плане цитогенетические методы при всем разнообразии их отдельных этапов направлены на выявление геномных и хромосомных мутаций. Основным подходом к решению этой задачи является кариотипирование, то есть определение числа и анализ структуры митотических хромосом с использованием дифференциальной окраски, позволяющей идентифицировать все хромосомы набора. Остальные методы хромосомного анализа либо дополняют кариотипирование, либо используются для решения специальных задач (подробнее см. главу 4).

а)



б)

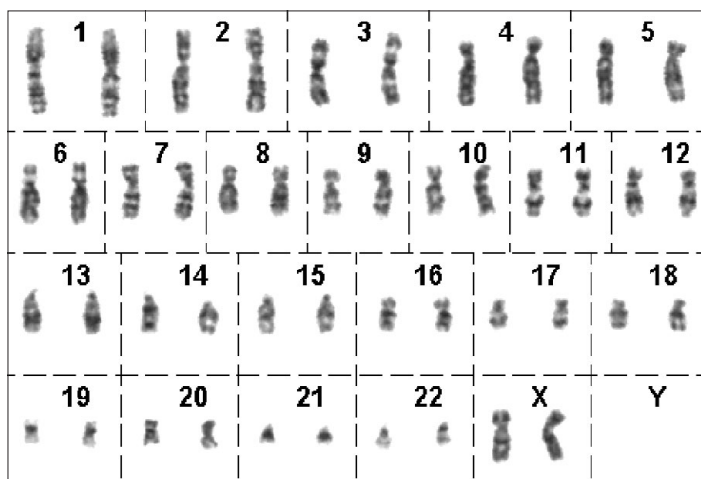


Рис.2.1. Метафазная пластинка (а) и кариограмма (б) хромосом человека из ФГА-стимулированного лимфоцита периферической крови (кариотип 46,XX). Дифференциальная G-окраска хромосом с использованием трипсина и красителя Гимза (метод GTG)

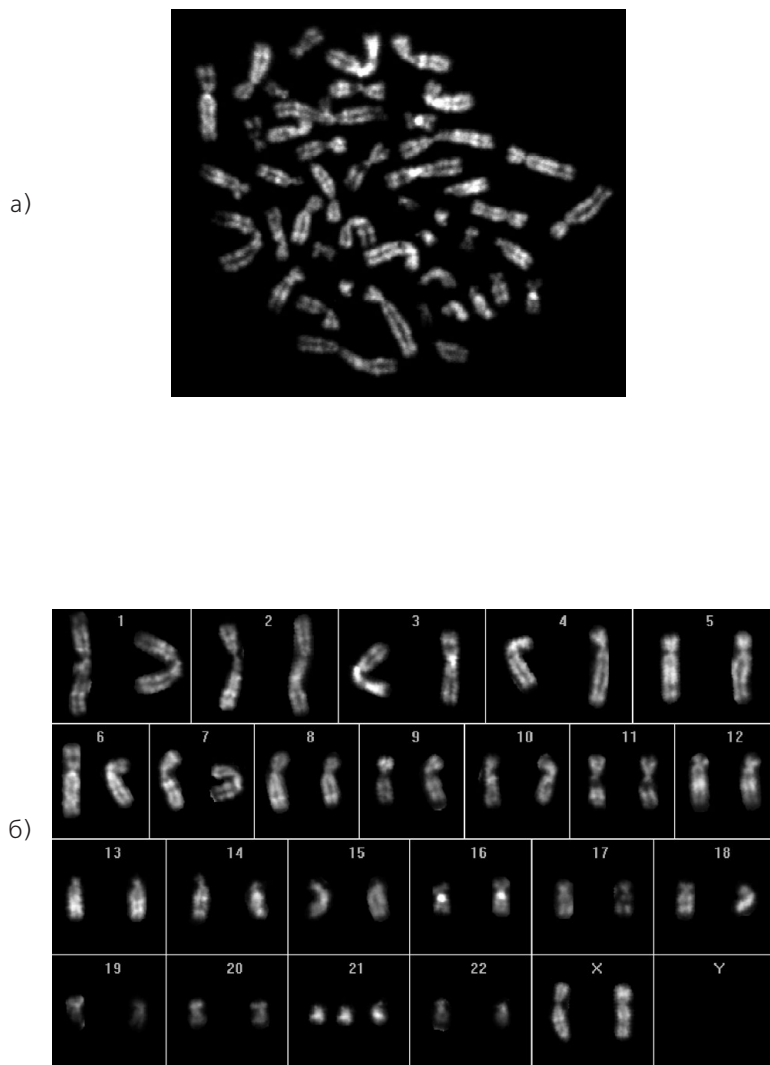


Рис.2.2. Метафазная пластинка (а) и кариограмма (б) хромосом человека из цитотрофобласта хориона (кариотип 47,XX,+21). Дифференциальная окраска хромосом флуорохромом Hoechst 33258 с контрастированием актиномицином D (метод QFH)

Кариотипирование является основным методом в клинической цитогенетике и обязательным компонентом комплекса методов пренатальной диагностики хромосомных болезней. Напомним, что к хромосомным болезням относят такие формы врожденной патологии развития и функционирования органов и систем, которые обусловлены геномными или хромосомными мутациями.

Аналізу механизмов образования и особенностей фенотипического проявления хромосомных и геномных мутаций в эмбриогенезе человека целесообразно предпослать краткий обзор основных характеристик кариотипа и методов его исследования.

2.1. Краткая характеристика цитогенетических методов

В зависимости от особенностей материала методы приготовления хромосомных препаратов подразделяются на две категории.

1. *Прямые методы* применяются при исследовании тканей, обладающих высокой митотической активностью (костный мозг, лимфатические узлы, любые ткани эмбриона на ранних стадиях развития и хорион/плацента до 20-й недели беременности), а также при исследовании мейотических хромосом.

2. *Непрямые методы* включают получение препаратов хромосом из любой ткани после стимулирования пролиферации клеток в условиях *in vitro*. Тип культуры (монослой или суспензия) и длительность культивирования (от нескольких часов и дней до нескольких недель) определяются типом клеток.

В зависимости от стадии клеточного цикла проводятся следующие исследования:

1. Исследования отдельных хромосом и их участков в интерфазных ядрах:
 - анализ полового хроматина в клетках букального эпителия основан на регистрации неактивной X-хромосомы (X-хроматин) или гетерохроматинового участка Y-хромосомы (Y-хроматин); используется как ориентировочный тест при диагностике нарушений в системе половых хромосом;
 - анализ численных и структурных аномалий, затрагивающих конкретные участки хромосом методом FISH; позволяет полу-

чить ограниченную информацию о конкретной аномалии кариотипа, а также повысить производительность традиционного цитогенетического анализа в случаях мозаичных вариантов численных аномалий.

2. Исследование профазных хромосом (сперматоциты на стадии пахитены); используется при установлении причин мужского бесплодия.
3. Исследование прометафазных хромосом (высокий уровень разрешения); необходимо для цитогенетической диагностики синдромов, обусловленных микроперестройками хромосом.
4. Исследование метафазных хромосом (ФГА-стимулированных лимфоцитов, клеток костного мозга, фибробластов кожи, эмбриональных и экстраэмбриональных тканей), полученных прямыми и непрямими методами; используется для установления хромосомного статуса пациента в клинической и пренатальной цитогенетике.
5. Исследование стадий анафазы — телофазы; используется для регистрации специфического воздействия различных мутагенов.

Для исследования препаратов используются различные методы окраски всех хромосом набора, а также индивидуальных хромосом или их отдельных участков. Методы дифференциальной окраски и особенно молекулярно-цитогенетические методы (различные варианты гибридизации *in situ*) позволяют точно идентифицировать хромосомы человека на разных стадиях развития, в разных тканях и на разных стадиях митоза, установить точную природу хромосомных перестроек, идентифицировать маркерные хромосомы и т. д. Многочисленные методы, позволяющие выявить линейную гетерогенность хромосом, условно можно подразделить на три группы — избирательное связывание красителя (флуорохрома) с определенными нуклеотидами молекулы ДНК; различные предобработки хромосомных препаратов перед окраской неспецифическим красителем (обычно красителем Гимза); исследования, основанные на асинхронности репликации отдельных участков хромосом. Особую группу представляют методы избирательной окраски, использующиеся для специфического выявления отдельных участков хромосом. Для обозначения методов окраски применяется трехбуквенная система, подразумевающая способ получения и

визуализации определенного типа сегментации (см. Приложение). В настоящее время разработано также множество методов, позволяющих не только подробно изучить тонкую структуру отдельных районов хромосом, но и получить информацию об их функциональной активности. Так, метод NOR-окраски с использованием азотнокислого серебра позволяет судить о транскрипционной активности *p*-генов и степени их функционирования, метод ник-трансляции *in situ* и использование специфических антител — о функциональной активности некоторых блоков генов (см. главу 10).

Протоколы получения различных типов дифференциальной окраски (их световые и люминесцентные варианты), наиболее широко используемые в практике, а также метода неизотопной гибридизации ДНК–ДНК *in situ* (FISH) приведены в Приложении.

2.2. Особенности кариотипа человека

Для характеристики кариотипа используют систематизированные определенным образом видеоизображения гомологичных хромосом всего хромосомного набора — кариограммы (рис. 2.1, б; 2.2, б), либо схематичные изображения каждого гомолога — идеограммы (см. Приложение).

При кариотипировании обычно руководствуются критериями и правилами, установленными Международным комитетом по стандартизации цитогенетических исследований, последняя версия которых опубликована в 2005 году [510]. Результатом хромосомного анализа является описание кариотипа в виде формулы с указанием числа хромосом, набора половых хромосом и хромосомных aberrаций (если они выявлены). Некоторые из символов и сокращений, принятых в цитогенетике человека, приведены в приложении. Более подробно с основными правилами международной цитогенетической номенклатуры, переведенными на русский язык, можно ознакомиться в изданиях отечественных авторов [38, 124].

В норме кариотип человека содержит 46 хромосом. Такое диплоидное (удвоенное) число возникает в результате объединения родительских гамет, каждая из которых содержит половинное, гаплоидное число хромосом, равное 23. Таким образом, зародыш человека со стадии зиготы имеет 23 пары хромосом, 22 из которых являются аутосомами

и 1 пара — половыми хромосомами, или гоносомами (X и Y). Наличие двух половых X-хромосом (кариотип 46,XX) соответствует женскому полу, наличие X- и Y-хромосом (кариотип 46,XY) — мужскому.

Хромосомы отличаются между собой размерами, формой и строго индивидуальным для каждой пары хромосом рисунком дифференциальной исчерченности.

Форма хромосомы определяется локализацией центромеры (первичной перетяжки) — участка хромосомы, входящего в состав кинетохора, к которому прикрепляются микротрубочки веретена деления (митотического или мейотического). В зависимости от центромерного индекса, то есть соотношения короткого плеча к длине всей хромосомы, хромосомы человека подразделяются на три группы — метацентрические (размеры короткого (p) и длинного (q) плеч практически одинаковы), субметацентрические (центромерный индекс 26–46%) и акроцентрические (центромерный индекс 15–30%). Особенностью коротких плеч всех акроцентрических аутосом человека является наличие спутничных нитей и спутников.

Согласно Международной номенклатуре хромосом человека (ISCN), аутосомы человека пронумерованы в порядке уменьшения их размеров (от 1 до 22) и подразделены на 7 групп (от А до G):

группа А (1–3) — большие метацентрические хромосомы 1, 3 и субметацентрическая хромосома 2;

группа В (4 и 5) — большие субметацентрические хромосомы;

группа С (аутосомы 6–12 и половая X-хромосома) — средние субметацентрические хромосомы;

группа D (13–15) — большие акроцентрические хромосомы;

группа E (16–18) — малые субметацентрические хромосомы;

группа F (19–20) — малые метацентрические хромосомы;

группа G (21–22) — малые акроцентрические хромосомы.

Y-хромосома относится к акроцентрическим, однако в отличие от 5 пар акроцентрических аутосом ее короткое плечо не содержит спутничных нитей и спутников, а размеры длинного плеча варьируют от хромосом группы G до группы D.

Хромосомы человека состоят из линейно расположенных участков (сегментов, блоков, англ. — band), отличающихся по структурным характеристикам и молекулярной композиции. Свойственная

всем хромосомам блочная организация выявляется при использовании различных методов дифференциального окрашивания. Центромерные районы (С-сегменты) являются обязательным структурным компонентом любой хромосомы в кариотипе человека. Однако по величине С-блоков наблюдается выраженный межиндивидуальный полиморфизм, обусловленный различными размерами прицентромерных областей. С-полиморфизм наиболее характерен для прицентромерных районов длинных плеч хромосом 1, 9, 16 и коротких плеч хромосом 15 и 22, а также для варьирующего по величине дистального участка длинного плеча Y-хромосомы. В состав С-сегментов входят простые и более сложные нуклеотидные повторы сателлитной ДНК. Каждой паре хромосом человека свойственна своя, присущая только ей альфоидная ДНК, со своим типом тандемных повторов. На основе альфоидных ДНК были созданы и получили широкое применение в цитогенетике хромосом-специфические ДНК-зонды, позволяющие вести подсчет индивидуальных хромосом и идентифицировать центромерные районы гомологов не только в метафазных, но и в интерфазных клетках.

Другим важным структурным компонентом каждой хромосомы являются теломеры — концевые участки хромосом, которыми в интерфазном ядре хромосомы прикрепляются к внутренней ядерной мембране. Теломерные районы (Tel-блоки) всех хромосом образованы многократно повторенными (несколько тысяч раз) простыми шести-нуклеотидными фрагментами (TTAGGG).

Плечи хромосом проявляют характерный для каждой пары хромосом рисунок из чередующихся темных (ярких) и светлых (тусклых) полос. Выявляющиеся участки хромосом обозначаются в зависимости от типа окраски Q-, G- и R-сегментами, а поперечная исчерченность хромосом — соответственно Q-, G- и R-рисунком. Q- и G-рисунки идентичны, R-рисунок (reverse) им комплементарен.

G⁺(Q⁺)-сегменты обогащены АТ-нуклеотидами и содержат сравнительно мало генов. По некоторым данным, в этих сегментах преимущественно находятся гены, ответственные за тканевую (терминальную) дифференцировку клеток (см. главу 11).

R-сегменты обогащены CG-парами оснований ДНК. В них сосредоточено основное число генов, в том числе генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), продукты которых обеспечивают жизнедеятельность клеток (дыхание, энергетический обмен и др.). В одном

сегменте, выявляемом при окраске прометафазных хромосом, содержится в среднем около 1 млн пар нуклеотидов, что примерно соответствует 10–15 генам (см. главу 11).

Согласно номенклатуре [510], каждая хромосома человека подразделяется на районы, границами которых являются регулярно наблюдаемые морфологические маркеры. В свою очередь, районы подразделяются на сегменты, заметно отличающиеся от соседних по интенсивности окраски. Нумерация всех сегментов начинается от центромеры к теломере отдельно для каждого плеча хромосомы. Запись индивидуального сегмента включает информацию о хромосоме, плече и районе, в котором он находится. На менее спирализованных хромосомах сегменты могут подразделяться на несколько частей — субсегментов, для обозначения которых вводятся новые ряды цифр. Например, запись 7q21.1 обозначает субсегмент 1 первого сегмента в районе 2 длинного плеча хромосомы 7. Число и расположение сегментов строго специфично для каждой пары гомологов, что позволяет не только проводить их точную идентификацию, но и широко использовать при анализе структурных хромосомных перестроек. В приложении приведены стандартные идеограммы хромосом человека для пяти уровней разрешения — 300, 400, 550, 700 и 850 сегментов на гаплоидный геном.

Структурными компонентами коротких плеч пяти пар акроцентрических аутосом в кариотипе человека являются спутники (s) и спутничные нити (stk) (англ. satellites и satellite stalks соответственно). Варьирующая в широких пределах величина спутников, а также длина и толщина спутничных нитей приводят к выраженному гетероморфизму гомологов хромосом групп D и G. Среди полиморфных вариантов встречаются также хромосомы с двойными спутниками и двойными ядрышкообразующими районами (ЯОР). Спутники представлены сатДНК. Спутничные нити (вторичные перетяжки), являясь по существу ядрышкообразующими районами, обозначаются N- или Ag-NOR блоками. В ЯОР локализованы многократно повторяющиеся кластеры рибосомных генов. Каждая акроцентрическая хромосома содержит различное число *p*-генов. Наряду со спутниками и спутничными нитями неравномерное распределение копий генов рРНК, а также различный уровень их экспрессии лежат в основе структурного и функционального полиморфизма индивидуальных ЯОР (см. главу 10).

2.3. Полиморфизм хромосом человека

Хромосомный полиморфизм является одной из отличительных особенностей кариотипа человека. Под полиморфизмом понимают нормальную изменчивость хромосом набора, которая заключается в различиях между гомологичными хромосомами (гетероморфизм) по отдельным сегментам, районам и даже целым плечам. К полиморфным вариантам относят такие изменения хромосом, которые сохраняются в процессе онтогенеза, стабильно наследуются при митотическом делении клетки и передаются как простой менделевский признак от родителей к детям, не оказывая влияния на фенотип. Существование различных вариантов характерно практически для каждой хромосомы человека, а неограниченное число сочетаний таких вариантов приводит к уникальности кариотипа каждого человека, за исключением монозиготных близнецов.

Полиморфизм хромосом у человека крайне богат по своим проявлениям. Правила кариотипирования предусматривают учет полиморфных вариантов хромосом с помощью специальной системы символов (табл. 2.1). Как уже упоминалось, в широких пределах варьируют размеры С-блоков, особенно на хромосомах 1, 9, 15, 16, 19, 22 и Y. В популяции широко представлены варианты хромосом 9 и особенно 19, различия между которыми обусловлены не только размерами, но и расположением прицентромерного гетерохроматина — на длинном или коротком плече хромосомы, или одновременно на коротком и длинном плечах. Гетерохроматиновые блоки легко визуализируются практически при любом способе окраски хромосом, однако наиболее четко — при специальных методах (СВГ и DA/DAPI). Иногда гетерогенность прицентромерных районов, например, на хромосомах 3 и 4, выявляется лишь при люминесцентных вариантах окрашивания (QFQ, QFH, DAPI). Некоторые варианты хромосом, в частности, 17ps, наблюдаемые на окрашенных красителем Гимза препаратах, не будут зарегистрированы при окрашивании флуорохромами. Подробная информация о полиморфизме хромосом представлена в книге А. А. Прокофьевой-Бельговской [158], а также в прекрасно иллюстрированном атласе хромосом человека [64], которые с момента издания являются настольной книгой всех цитогенетиков человека.

Таблица 2.1. Перечень символов, употребляемых при описании полиморфных вариантов хромосом человека [510]

1. Полиморфные размеры гетерохроматиновых сегментов, спутничных нитей и спутников	
9qh+	Увеличенный гетерохроматиновый блок на длинном плече хромосомы 9
Yqh-	Уменьшенный гетерохроматиновый блок на длинном плече Y-хромосомы
21ps+	Увеличенные спутники на коротком плече хромосомы 21
22pstk+	Удлиненные спутничные нити на коротком плече хромосомы 22
15cenh+	Увеличенный блок прицентромерного гетерохроматина на хромосоме 15
1qh-, 13cenh+, 22ps+	Уменьшенный гетерохроматиновый блок на хромосоме 1, увеличенный прицентромерный гетерохроматин на хромосоме 13 и увеличенные спутники на коротком плече хромосомы 22
15cenh+mat, 15s+pat	Увеличенный прицентромерный гетерохроматиновый блок на хромосоме 15, унаследованной от матери, и увеличенные спутники на хромосоме 15, унаследованной от отца
14cenh+pstk+ps+	Увеличенный блок прицентромерного гетерохроматина, длинные спутничные нити и увеличенные спутники на коротком плече хромосомы 14
2. Полиморфная локализация гетерохроматиновых сегментов, спутничных нитей и спутников	
17ps	Спутники локализованы на коротком плече хромосомы 17
Yqs	Спутники локализованы на длинном плече Y-хромосомы
9qhph	Локализация прицентромерного гетерохроматинового блока на коротком и длинном плечах хромосомы 9
9ph	Гетерохроматиновый блок присутствует только на коротком плече хромосомы 9
1q41	Гетерохроматиновый блок локализован в сегменте 1q41
3. Полиморфизм числа спутников и спутничных нитей	
21pss	Двойные спутники на коротком плече хромосомы 21
14pstkstk	Двойные спутничные нити на коротком плече хромосомы 14

Несмотря на многочисленные попытки определить влияние тех или иных вариантов хромосом на фенотипические или клинические особенности их носителей, вопрос о функциональном значении хромосомного полиморфизма по-прежнему далек от своего разрешения. Устоявшимся с 1970-х годов в клинической генетике является мнение, что гетероморфизм гомологов по районам 1qh, 9qh (в большей степени 9ph), 16qh и некоторые варианты Yqh могут негативно влиять на репродуктивную функцию, а вариант Yqh⁺ сопровождается и психоэмоциональными особенностями поведения [117, 134, 150]. Механизмы этого влияния по-прежнему остаются на уровне гипотез. Результаты многочисленных исследований на эту тему столь противоречивы, что признать ассоциацию определенного полиморфного варианта хромосомы с какой-либо фенотипической или клинической особенностью организма не представляется возможным. Справедливости ради следует отметить, что исключительное большинство этих популяционных исследований проведено в постнатальном периоде онтогенеза человека, а выводы о повышенном риске невынашивания беременности при наличии выраженного гетероморфизма у носителей или пороков развития у их потомков основаны исключительно на анамнестических данных. Что касается корреляций между хромосомным полиморфизмом и особенностями внутриутробного развития человека, то единичные исследования медицинских и спонтанных абортусов [117] вряд ли можно признать достаточными для доказательства влияния столь изменчивых районов гетерохроматина и/или ядрышковых организаторов на жизнеспособность эмбриона или, к примеру, их влияния на органогенез. Очевидно, что полученные данные не позволяют как однозначно принять мнение о нейтральности структурного и функционального полиморфизма хромосом, так и согласиться с его вкладом в те или иные патологические состояния на любом этапе онтогенеза человека.

К сожалению, расшифровка генома человека не приблизила нас к пониманию значения различного числа копий повторяющейся ДНК, из которой, в основном, состоят полиморфные гетерохроматиновые участки хромосом, в норме и при патологии. К обсуждению фундаментальных и прикладных проблем, имеющих отношение к этим загадочным участкам генома человека, мы вернемся в главах 6,9–11.

Особое место среди полиморфных вариантов хромосом занимают хромосомы групп D и G. Помимо вариабельных по размеру прицентромерных блоков, их короткие плечи отличаются разнообразием по числу и размерам спутников. Для этих ядрышкообразующих хромосом характерен не только структурный, но и функциональный полиморфизм, регистрируемый с помощью окраски азотнокислым серебром. Подробно молекулярные основы полиморфизма районов ядрышковых организаторов и его роль в нормальном и патологическом эмбриогенезе человека рассмотрены нами в главе 10.

2.4. Краткая характеристика молекулярной гетерогенности сегментов хромосом человека

В отличие от безуспешных попыток понять фенотипические проявления полиморфизма хромосом, молекулярная природа вариабельных участков достаточно хорошо изучена. Главное, что отличает различные сегменты хромосом — это богатая по проявлениям неоднородность их структурной и функциональной организации (табл. 2.2).

Так, общим феноменом является наличие в каждой хромосоме двух типов хроматина — эухроматина и гетерохроматина.

В отличие от гетерохроматина, структурно-функциональные свойства эухроматиновых районов более или менее изучены. По крайней мере, нуклеотидная последовательность молекулы ДНК эухроматиновой части генома человека практически полностью расшифрована [315]. Установлено, что эухроматин состоит из однокопийных последовательностей ДНК и содержит большую часть структурных генов [203]. Эухроматин деконденсирован в метаболически активном интерфазном ядре и реплицируется в течение всего периода фазы синтеза, что свидетельствует о его активном участии в процессе транскрипции. Вместе с тем, относящиеся к эухроматину R- и G-сегменты отличаются по насыщенности генами и их специфичности, нуклеотидному составу, конформации, времени репликации (подробнее см. главу 10).

В эухроматине выявлено несколько различных фракций ДНК длиной около 300 т. п. н., названных изохорами [252]. Изохоры различаются по процентному содержанию GC-пар: L — легкие изохоры с низким содержанием GC-пар; H1, H2, H3 — тяжелые изохоры, богатые GC-парами. Изохоры распределены в хромосомах неслучайным образом. Так, легкие

Таблица 2.2. Основные различия C-, R- и G-блоков хромосом человека

Характеристика	R-блоки	G-блоки	C-блоки
Нуклеотидный состав ДНК	Обогащенность GC-парами	Обогащенность AT-парами	Обогащенность AT-парами
Содержание повторов	Повторы SINE	Повторы LINE-богатые	Сателлитные повторы I, II, III класса
Тип изохоров	GC-богатые (тяжелые) изохоры	AT (легкие) изохоры	AT-богатые изохоры
Содержание CpG-островков	Обогащенность	Относительная обедненность	Очень мало
Уровень ацетилирования гистонов	Высокий	Низкий	Низкий
Время репликации в S-фазе	Ранняя	Средняя, поздняя	Поздняя
Состояние в интерфазе	Деконденсирован	Относительно деконденсирован	Конденсирован
Обогащенность генами	Высокая концентрация (гены домашнего хозяйства)	Низкая концентрация (тканеспецифичные гены)	Низкая или полное отсутствие
Чувствительность к протеолитическим ферментам	Очень высокая	Высокая	Низкая, практически полностью отсутствует
Чувствительность к нуклеазам (DNКаза I, II, рестриктазы)	Очень высокая	Высокая	Низкая
Частота кроссинговера	Очень высокая	Низкая	Очень низкая, отсутствие

изохоры преимущественно локализованы в G-сегментах хромосом, в то время как тяжелые изохоры — в основном в R-сегментах, при этом плотность распределения тяжелого изохора H3 в сегментах хромосом пропорциональна количеству содержащихся в них генов [496].

Гетерохроматин в хромосомах человека в свою очередь подразделяется на структурный, или конститутивный, и факультативный гетерохроматин. Конститутивный, или структурный, гетерохроматин образует постоянные структурные элементы в парах гомологичных хромосом и располагается преимущественно в околоцентромерных районах, а также в дистальном отделе длинного плеча Y-хромосомы [158, 163, 819].

Как уже упоминалось, конститутивный гетерохроматин человека состоит из сателлитной ДНК I–III классов (с длиной повторяющейся последовательности 1–20 п. н.), а также из сателлитной ДНК α -, β - и γ -типов (с длиной отдельного повтора 170 п. н., 68 п. н. и 220 п. н. соответственно) [485, 620]. Сателлитные повторы имеют различную обогащенность АТ- и СG-парами оснований (класс I обогащен АТ-парами, классы II и III содержат как АТ-, так и СG-пары) и специфично распределены по хромосомам. Прицентромерный гетерохроматин хромосом 3 и 4 представлен, в основном, сатДНК I. В прицентромерном гетерохроматине хромосом групп D и G, а также в районе Yqh локализованы сатДНК классов I и III. В состав 16qh входит преимущественно сатДНК II, 1qh — сателлиты II и III классов, 9qh — сатДНК III [610]. Известно, что сатДНК III хромосомы 9 состоит из пентамеров, 5–15% которых содержат CpG-последовательности [523]. Распределение α -, β - и γ -сателлитных ДНК также хромосомспецифично. Так, α -сателлит находится в составе гетерохроматина хромосом 1, 11, 13, 14, 15, 17, 21, 22, X и Y; β -сателлит — в прицентромерных районах хромосом 3 и 9, а также в районе Yqh; γ -сателлит — в центромерах хромосом 8 и X [485, 620].

Термин «факультативный гетерохроматин» относится к гетерохроматинизированному эухроматину, который присутствует не в обеих, а в одной из двух гомологичных хромосом [32]. Если конститутивному гетерохроматину присуще неизменное, стабильное конденсированное состояние, то факультативный гетерохроматин свойственен какой-либо определенной стадии развития или типу клеток.

Классическим примером факультативного гетерохроматина является функционально неактивная (инактивированная) X-хромосома,

представленная в интерфазных соматических клетках, имеющих две X-хромосомы, в виде так называемого тельца полового хроматина (тельце Барра). Отметим, что инактивация одной из X-хромосом у зародышей женского пола происходит в раннем эмбриогенезе, точнее на стадии бластоцисты, тогда как перед вступлением ооцитов в мейоз происходит ее реактивация (см. главу 1). Примером обратимой гетерохроматизации может быть и половой пузырь, образуемый X- и Y-хромосомами в сперматогенезе и наблюдаемый лишь в профазе мейоза (на стадиях зиготены — пахитены).

Факультативный гетерохроматин, в отличие от конститутивного хроматина, содержащего различные классы сателлитной ДНК, обогащен протяженными повторяющимися последовательностями типа LINE, которые способствуют конденсации хроматина. Наличие LINE повторов в G-сегментах сближает эти районы метафазных хромосом с факультативным гетерохроматином [610]. Гетерохроматиновые районы поздно реплицируются, метилированы и содержат гипоацетилированные гистоны, вследствие чего эти сегменты хромосом обычно транскрипционно инертны или обладают пониженной транскрипционной активностью (см. также главу 10).

В заключение следует отметить, что в настоящее время, благодаря успешному завершению программы «Геном человека», практически полностью определена нуклеотидная последовательность гигантской (1,7 м) молекулы ДНК человека и получены карты нуклеотидных последовательностей каждой из 23 пар хромосом [316, 497]. Определено и общее число генов человека (около 35 000). К марту 2005 года на хромосомах человека было картировано около 16 000 генов, однако местоположение многих из них нуждается в уточнении. При этом было обнаружено, что «насыщенность» генами разных хромосом существенно варьирует. Больше всего генов пока локализовано на самой большой хромосоме 1 (873). Самой «обедненной» генами оказалась Y-хромосома (всего 46 генов). Самой «эухроматиновой» (насыщенной генами) с учетом небольших размеров оказалась хромосома 19. В ней уже картировано 603 гена, то есть больше, чем в хромосоме 2 (570), в 3,5 раза превышающей ее абсолютные размеры. Информацию о генах, идентифицированных на разных хромосомах человека, можно получить на ежедневно обновляющемся интернет-сайте National Center Biotechnological Information USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

В различных хромосомах значительно варьирует не только плотность генов как таковых, но также генов, отличающихся активной транскрипцией. Так, насыщенность транскрибируемыми единицами максимальна для хромосом 17 и 19. Хромосомы 16 и 11 также содержат большое число активно транскрибируемых локусов, в то время как хромосомы 4, 13, 21, X и Y характеризуются наименьшей плотностью экзонов [203]. Информация о транскрибируемых последовательностях доступна на сайте <http://www.genecards.org>.

Заключение

Современная цитогенетика обладает богатым набором методов, позволяющих не только с уверенностью кариотипировать зародыши человека на любой стадии развития, идентифицировать любые хромосомные перестройки, но и непосредственно изучать особенности функциональной активности индивидуальных хромосом и их отдельных сегментов. Совмещение карт цитогенетического и молекулярного картирования открывает ранее неизвестные возможности для выяснения особенностей фенотипического проявления дисбаланса определенных блоков генов в условиях хромосомных и геномных мутаций, роли районов ядрышковых организаторов и процессов метилирования в ходе нормального и патологического эмбриогенеза человека. Все эти достижения цитогенетики и генетики человека позволяют подойти к пониманию структурно-функциональной организации генома человека на новом, ранее недоступном уровне. Достаточно подробно изученный эмбриогенез человека (см. главы 1 и 8) в сочетании с большими методическими возможностями пренатальной диагностики (см. главы 4 и 9) делают такой подход особенно интересным и продуктивным.

ГЛАВА 3

МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА

Введение

Хромосомные аномалии могут возникать на любой стадии онтогенеза. Для цитогенетики развития особенно важны те нарушения кариотипа, которые возникают в гаметогенезе, при оплодотворении и на ранних (начальных) стадиях развития.

В данной главе приводится классификация основных типов хромосомных аномалий и дана краткая характеристика механизмов их возникновения. Подробную информацию можно получить в монографиях и руководствах [31, 56, 187].

Для описания типов хромосомных аномалий используются символы международной номенклатуры [510] (Приложение, табл. 1).

3.1. Классификация хромосомных аномалий

Хромосомные аномалии подразделяют на *геномные* и *структурные*. Первые связаны с изменением числа хромосом, вторые — их структуры.

3.1.1. Геномные мутации

Геномные мутации могут затрагивать весь геном или отдельные хромосомы. Напомним, что в норме в каждой соматической клетке человека имеется диплоидный набор хромосом, равный 46. Любые отклонения от этого модалного числа являются численными аномалиями — *гетероплоидией*. При этом изменения числа хромосом могут быть либо кратными гаплоидному набору, либо некрратными ему.

У человека изменения числа хромосом на уровне гаплоидного генома ограничиваются *триплоидией* ($3n=69$) — наличием лишних 23 хромосом, которые могут иметь отцовское или материнское происхождение. При этом кариотип $69,XY$ летален, в то время как триплоидия $69,XXX$ и $69,XXY$ вполне совместима с внутриутробным развитием и живорождением.

Тетраплоидия ($4n=92$) как конституциональная форма кариотипа представлена только в клетках эмбрионов до стадии бластоцисты. Однако тетраплоидия характерна и для некоторых тканей (клетки трофобласта, печени, мегакариоциты).

Анеуплоидия — изменения числа отдельных хромосом, некрратные гаплоидному набору, представлена следующими видами:

- *Трисомия* ($2n+1=47$) — наличие дополнительной гомологичной хромосомы. Известны случаи *множественных трисомий*, которые обусловлены сочетанием трисомий по двум или трем разным хромосомам ($2n+1+1=48$ или $2n+1+1+1=49$);
- *Полисомия* (крайне редкая для аутосом форма анеуплоидии) — увеличение числа в пределах одной пары гомологичных хромосом, характерна для системы половых хромосом (например, трисомия X-хромосом — $47,XXX$, тетрасомия — $48,XXXX$, пентасомия — $49,XXXXX$; дисомия Y-хромосомы — $47,XY$);
- *Моносомия* ($2n-1=45$) — отсутствие одной из гомологичных хромосом;
- *Нуллисомия* ($2n-2=44$) — отсутствие обеих гомологичных хромосом. Отсутствие двух гомологов обычно приводит к гибели соматических клеток, поэтому нуллисомия при стандартном кариотипировании практически не встречается. Однако, гипогамплоидия, обусловленная утратой одной из хромосом набора ($n-1=22$), относительно часто регистрируется при анализе хромосомного набора зрелых сперматозоидов и неоплодотворенных ооцитов в метафазе второго мейотического деления.

Моносомия по любой из аутосом, как и нуллисомия X-хромосом (кариотип $45,Y$), является летальной, поэтому их обнаружение на метафазных пластинках обычно связано с погрешностями при приготовлении препаратов. В клинической цитогенетике описаны случаи сочетания моносомии (исключительно моносомии X-хромосомы) с

трисомией по какой-либо из аутосом, при этом общее число хромосом в наборе соответствует диплоидному ($2n-1+1=46$).

Если геномная мутация присутствует во всех клетках зародыша, ее называют *истинной*, или *полной*, формой.

Присутствие на хромосомных препаратах клеточных клонов от разных зародышей (например, с наборами гоносом XX и XY) позволяет заподозрить наличие *химеризма (chi)*.

Если геномная мутация определяется только в отдельных клетках одного организма, возникшего из одной зиготы, говорят о *мозаицизме хромосом*, или *мозаичной форме гетероплоидии (mos)*.

Однородительская дисомия (англ. — **uniparental disomy**, или **upd**) — недавно описанный у человека новый тип хромосомных аномалий. В этом случае кариотип представлен нормальным диплоидным числом хромосом, однако одна пара гомологов представлена хромосомами только одного из родителей (только материнскими — **updmat** или только отцовскими — **updpat**). При этом возможна ситуация, когда в кариотипе присутствуют оба гомолога от одного родителя — гетеродисомия, либо удвоенной оказывается одна из гомологичных хромосом — изодисомия.

3.1.2. Хромосомные мутации

Структурные хромосомные перестройки — нарушения кариотипа, сопровождающиеся или не сопровождающиеся дисбалансом генетического материала в пределах одной или нескольких хромосом (*внутрихромосомные* и *межхромосомные перестройки* соответственно).

3.1.2.1. Межхромосомные перестройки

К межхромосомным перестройкам относятся транслокации (**t**), то есть перемещение генетического материала между хромосомами. Транслокации подразделяются на следующие типы.

- *Реципрокные транслокации (recp)* — взаимный обмен, т. е. обмен фрагментами между двумя (реже — тремя или более) негомологичными хромосомами — не сопровождаются изменением числа хромосом и дисбалансом генетического материала.
- *Нереципрокные транслокации* — обмен хромосомными фрагментами, обычно приводящий к несбалансированному кариотипу.

- *Робертсоновские транслокации (rob)*, или центрические слияния хромосом — воссоединение плеч двух акроцентрических хромосом в околоцентромерных районах. При этом число хромосом в кариотипе уменьшается на одну, так как обычно одна из центромер и короткие плечи двух акроцентриков с локализованными в них ядрышкообразующими районами утрачиваются.

Наконец, в качестве варианта межхромосомных перестроек можно рассматривать *инсерцию (ins)* — перемещение фрагмента одной хромосомы внутрь другой.

3.1.2.2. Внутрихромосомные перестройки

Внутрихромосомные перестройки представлены несколькими типами:

- *Пробелы (g)* (ахроматические, то есть неокрашенные области) и *разрывы* — могут быть хроматидными и хромосомными.
- *Делеция (del)* — утрата части хромосомы (концевые и интерстициальные).
- *Дупликация (dup)* — удвоение части хромосомы.
- *Инверсия (inv)* — переворот фрагмента хромосомы на 180°, не включающего область центромеры (*парацентрическая инверсия*), или с вовлечением центромеры (*перичентрическая инверсия*).
- *Изохромосома (i)* — метацентрическая (моно- или дицентрическая, **idic**) хромосома с генетически идентичными плечами (то есть удвоенными только длинными или только короткими).
- *Кольцевые хромосомы (r)* представляют собой одиночные (реже — двойные) замкнутые кольца с одной или двумя центромерами (моно- или дицентрические, соответственно).
- *Хромосомными фрагментами (fr)* и *маркерными хромосомами (mar)* обозначают сверхчисленные производные хромосом: мелкие ацентрические (**ace**) (т. е. не содержащие центромеру) или содержащие 1–2 центромеры. Маркерные хромосомы могут быть результатом как внутри-, так и межхромосомных перестроек. Для их идентификации используются различные цитогенетические методы. Особенно информативными являются различные варианты метода гибридизации *in situ* (метод FISH) с хромосом- и локуспецифическими ДНК-зондами.

Генетически сбалансированные хромосомные aberrации (*транслокации, инсерции, инверсии*), как правило, не сказываются на фенотипе носителя. Однако их наличие закономерно приводит к нарушению процессов спаривания гомологов в профазе мейоза и, как следствие этого, к образованию гамет с несбалансированными хромосомными aberrациями (*делециями и дупликациями*) и зигот с *частичной моно- или трисомией* по соответствующим участкам хромосом.

3.2. Механизмы возникновения геномных мутаций

3.2.1. Триплоидия ($3n = 69$)

Основными механизмами возникновения триплоидии являются нарушения оплодотворения, связанные с *диандрией* (присутствие в яйцеклетке двух отцовских геномов) или с *дигинией* (наличие в яйцеклетке лишнего гаплоидного генома матери).

Причиной диандрии, которая у человека встречается особенно часто, является оплодотворение одной яйцеклетки двумя сперматозоидами вследствие неэффективного блока полиспермии, либо оплодотворение яйцеклетки спермием с нередуцированным, диплоидным числом хромосом. Такие сперматозоиды могут возникать либо при созревании тетраплоидных сперматоцитов, либо при нарушении их цитотомии.

Лишний женский геном может появляться при блокаде первого либо, что происходит чаще, второго деления созревания яйцеклетки. Такой механизм возникновения триплоидии, характерный для некоторых лабораторных млекопитающих (в частности, мышей), сравнительно редко (около 8%) встречается в генезе триплоидии у человека.

3.2.2. Тетраплоидия ($4n = 92$)

Тетраплоидия может быть результатом одного из двух событий — блокирования веретена деления или эндомитоза. В первом случае диплоидный набор удваивается вследствие нерасхождения сестринских хроматид в анафазе, которые остаются в одном ядре. Такой тип поведения хромосом получил название К-митоза по аналогии с таковым после воздействия на клетку колхицина, который блокирует ве-

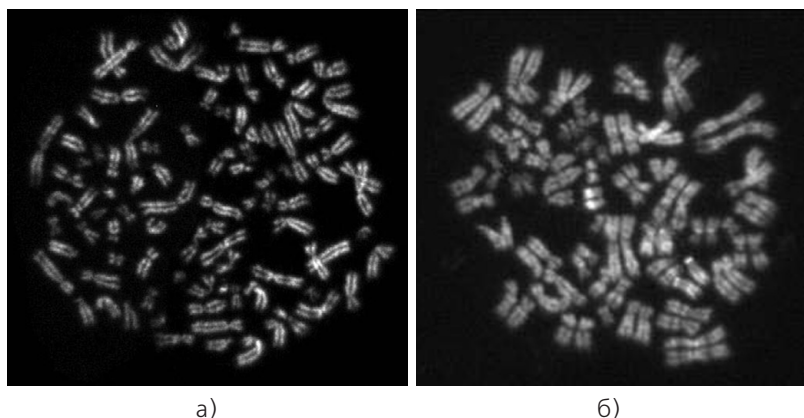


Рис.3.1. Тетраплоидные метафазные пластинки на прямых препаратах из хориона (окраска QFH/AcD): а — блокирование веретена деления (92,XXXX); б — эндомитоз (92,XXYY)

ретенено деления. В случае эндомитоза клеточный цикл оказывается незавершенным, при этом происходит два последовательных раунда репликации (эндоредупликация) хромосомной ДНК. После второго раунда репликации хромосомы могут завершить деление. Как правило, на стадии метафазы этого деления все хромосомы оказываются сдвоенными. Таким образом, тетраплоидия, в отличие от других геномных мутаций, обусловлена нарушением кариотомии и цитотомии исключительно при митотическом делении. Оба механизма образования тетраплоидии представлены в трофобласте. Так, тетраплоидные метафазные пластинки, особенно эндомитозы, сравнительно часто наблюдаются на прямых препаратах из хориона и плаценты (рис. 3.1).

3.2.3. Анеуплоидия

Анеуплоидия — (трисомия и моносомия) — возникает в результате нарушения сегрегации хромосом в митозе или в мейозе.

Классификация механизмов нерасхождения хромосом достаточно условна, так как все процессы, обеспечивающие клеточное деление взаимосвязаны и взаимозависимы.

В широком смысле, термин «нерасхождение» относится к любым нарушениям разделения хроматид или гомологичных хромосом в анафазе митоза или мейоза. Как правило, аномальное расхождение затра-

гивает одну пару хромосом. Нерасхождение нескольких пар хромосом, соответственно, приводит к множественным анеуплоидиям.

3.2.3.1. Основные механизмы возникновения анеуплоидии

Ниже рассмотрены основные механизмы возникновения анеуплоидии на примере аномальной сегрегации хромосом в мейозе (рис. 3.2).

3.2.3.1.1. Собственно нерасхождение хромосом

Собственно нерасхождение хромосом приводит к образованию дочерних анеуплоидных клеток — гипер- и гипоплоидных — вследствие сегрегации обеих гомологичных хромосом (хроматид) к одному полюсу в анафазе клеточного деления (истинное нерасхождение).

3.2.3.1.2. Предделение

Предделение — преждевременное разделение центромер. Предделение мейотических хромосом (*бивалентов*), как правило, сопровождается образованием унивалентов. Сегрегация унивалентов к разным полюсам регистрируется как нормальная сегрегация, к одному полюсу — как нерасхождение. В качестве одного из механизмов аномальной сегрегации хромосом в оогенезе рассматривается преждевременное разделение сестринских хроматид в первом делении мейоза [424]. Хромосомный набор во втором полярном тельце и ооците в этом случае будет определяться случайной комбинацией одиночных сестринских хроматид.

Преждевременное разделение хроматид и разрыхление центромерных районов хромосом при митотических делениях, сопровождающееся повышенной частотой образования анеуплоидных соматических клеток и микроядер, является цитогенетической характеристикой синдрома Робертса (OMIM 268300). Разъединение сестринских хроматид в центромерном районе одной из X-хромосом — относительно частое явление, наблюдаемое в отдельных 47,XXX лимфоцитах периферической крови у женщин с привычным невынашиванием [300].

3.2.3.1.3. Запаздывание хромосом

Запаздывание хромосом (*anaphase lagging*) — это полное отсутствие или замедленное относительно остальных хромосом движение хромосомы (или хроматиды) в анафазе, обусловленное, как прави-

I деление мейоза	
Нормальная сегрегация	
Истинное нерасхождение M I	
Случайная сегрегация унивалентов (ахиазматическое нерасхождение)	
Преждевременное расхождение сестринских хроматид	
II деление мейоза	
Нормальная сегрегация	
Истинное нерасхождение M II	
Случайная сегрегация сестринских хроматид	

Рис.3.2. Механизмы возникновения анеуплоидии в мейозе [457].

Варианты сегрегации гомологичных хромосом в анафазе первого деления мейоза: нормальное расхождение, совместное движение бивалента к одному полюсу («истинное нерасхождение»), случайная ориентация унивалентов и их независимое движение к одному полюсу («ахиазматическое нерасхождение»), преждевременное разделение сестринских хроматид и их случайная комбинация. Нерасхождение сестринских хроматид во втором делении мейоза обусловлено их неспособностью к разделению или движением одиночных хроматид к одному полюсу в анафазе II

ло, нарушением ее ориентации. По-видимому, ведущую роль в этом механизме играют нарушения микротрубочек веретена деления [396], формирования и функций *кинетохора* — части центромеры, ответственной за прикрепление микротрубочек митотического веретена [763, 793]. Обычно запаздывающие хромосомы элиминируются или образуют микроядра, что сопровождается моносомией при митотических делениях [396] или приводит к гипоглоидии при мейотических делениях [535].

3.2.3.1.4. Первичное и вторичное нерасхождение хромосом

Нерасхождение хромосом принято подразделять на *первичное* и *вторичное* [134].

Под первичным нерасхождением понимают аномальную сегрегацию хромосом в случае вступления в мейоз нормальной диплоидной клетки. Первичное нерасхождение в свою очередь подразделяют на три типа.

1. *Простое нерасхождение*, результатом которого являются гаметы с нуллисомией или дисомией.

2. *Двойное нерасхождение*, к которому относят сочетание (комplementацию) двух простых нерасхождений, одно из которых произошло в оогенезе, другое — в сперматогенезе.

3. *Последовательное нерасхождение*, приводящее к возникновению полисомий, является результатом двух событий нерасхождения одной и той же пары хромосом — сначала в первом, а затем и во втором делениях мейоза.

Нерасхождение хромосом в гаметогенезе у трисомного субъекта называется вторичным нерасхождением.

На многих модельных объектах твердо доказано, что существенную роль в нарушении сегрегации хромосом играет мейотическая рекомбинация, а также хорошо изучены гены, мутации в которых способствуют аномальной сегрегации хромосом. Механизмы возникновения анеуплоидии у человека, в отличие от модельных объектов, менее изучены, а «мейотические» мутации, влияющие на расхождение хромосом у человека, до сих пор не идентифицированы. Тем не менее, накопленные к настоящему времени факты свидетельствуют о сходстве механизмов аномальной сегрегации хромосом в мейозе у различных видов эукариот.

3.2.3.2. Роль рекомбинации в нерасхождении хромосом

Для исследования связи между рекомбинацией и сегрегацией хромосом у человека используют сравнение частот и локализации обменов и генетических карт сцепления в нормальном мейозе и при нерасхождении хромосом. Именно такой подход позволил доказать, что число и локализация хиазм (обменов) у дрозофилы находятся под генетическим контролем, который запрещает рекомбинацию в прицентромерных или теломерных участках, поскольку проксимальное и дистальное расположение хиазм препятствует нормальной сегрегации хромосом.

Наиболее детально изучена взаимосвязь между частотой и локализацией хиазм и нерасхождением хромосом 21 как у матерей, так и у отцов детей с синдромом Дауна [548]. Напомним, что нерасхождение хромосом 21 в сперматогенезе объясняет только 5–10% случаев синдрома Дауна, а соотношение ошибок сегрегации в первом и втором делениях мейоза близко к 1:1 [210]. Оказалось, что при нерасхождении отцовских хромосом в первом делении мейоза частота хиазм снижается, а во втором делении — соответствует нормальной [401]. В оогенезе, при трехкратном преобладании ошибок в первом делении мейоза [210], примерно половина случаев нерасхождения хромосом 21 в первом делении обусловлена полным отсутствием хиазм в биваленте, тогда как в остальных случаях оно сопряжено с наличием обменов в субтеломерных районах. При нерасхождении во втором делении обмены преимущественно регистрируются в прицентромерных участках хромосом 21 [292].

Аналогичные данные о локализации обменов были получены также при анализе 6 других типов нерасхождения (случаи 47,XXY отцовского происхождения, случаи трисомии половых хромосом, а также аутосом 16, 18 и 21 и однородительской дисомии 15 материнского происхождения) [548]. Сходные механизмы нарушения сегрегации хромосом в мейозе, обусловленные их рекомбинацией, предполагаются и для других аутосом [460], в том числе и для акроцентрических хромосом групп D и G [514].

Следовательно, нерасхождение хромосом в первом делении мейоза характеризуется подавлением рекомбинации и преимущественной локализацией хиазм в дистальных участках. При нерасхождении во втором делении мейоза большая часть рекомбинаций регистрируется

в проксимальных районах [401, 548, 675, 823]. Увеличение числа теломерных хиазм с большей вероятностью приведет к нерасхождению в первом делении, а прицентромерных — во втором делении мейоза [549].

Установлено, что ахиазматические биваленты подвержены аномальной сегрегации хромосом в первом делении мейоза, а проксимальные и дистальные обмены малоэффективны в обеспечении правильного расхождения хромосом. Полагают, что биваленты утрачиваются, если их удержание происходит только за счет дистальной хроматидной конъюгации [692]. Относительно влияния проксимальных хиазм на поведение бивалентов предложено две модели [292, 458]. Первая предполагает, что гомологичные хромосомы не разделяются в анафазе I, что ведет к утрате бивалента или его сегрегации к одному полюсу. Согласно другой модели, реализация проксимальных хиазм приводит к преждевременному расхождению хроматид и их независимой сегрегации к полюсам в анафазе первого или второго деления мейоза.

В любом случае, нерасхождение хромосом в мейозе не только зависит от рекомбинационных событий, происходящих в профазе I, но и определяется ими [823]. Результаты этих исследований легли в основу «двухударной» гипотезы возникновения трисомии, согласно которой первым «уязвимым» событием является формирование бивалентов и образование хиазм в профазе I и вторым — процесс их разделения в первом или втором делении мейоза [458].

3.2.3.3. Генетический контроль мейоза

В настоящее время известен целый ряд генов, экспрессия которых осуществляется только в мейозе [895]. Мутации в этих генах препятствуют созреванию гамет, блокируя клетки на тех или иных стадиях профазы I мейоза [225, 796]. Для некоторых из этих генов, идентифицированных у дрозофилы и дрожжей, установлено существование ортологов, то есть аналогов у других видов, что позволяет высказать предположение об их функциональной гомологии с генами, контролирующими оогенез и сперматогенез у млекопитающих [396]. Следует отметить, что многие из них относятся к семейству циклинов, осуществляющих контроль клеточного цикла в митозе и мейозе [895]. Вместе с тем, низкая частота анеуплоидии в сперматозоидах по сравнению с

таковой в ооцитах указывает на различия в механизмах контроля клеточного цикла и процессов презиготической селекции гамет в оогенезе и сперматогенезе [489, 499].

Так, критическими для нормальной сегрегации хромосом в анафазе являются завершение репликации, расположение хромосом на экваторе и прикрепление кинетохор к микротрубочкам веретена. Для большинства митотически делящихся клеток, а также для мейотических делений сперматоцитов незавершенность одного из этих событий приводит к блоку клеточного цикла на соответствующей стадии и зачастую к массовой гибели всего клона анеуплоидных клеток [395].

Нарушение процессов конъюгации и рекомбинации в сперматогенезе приводит к образованию унивалентов, к остановке мейоза в метафазе первого деления и, в конечном счете, — к гибели клетки. Таким образом, в сперматогенезе функционируют эффективные механизмы селекции aberrантных сперматоцитов, что приводит к элиминации гамет, в том числе и потенциально анеуплоидных [574].

В оогенезе мейоз протекает независимо от наличия унивалентов или нарушений формирования веретена, что свидетельствует об отсутствии характерной для сперматогенеза селекции гамет с хромосомными aberrациями [226]. В отличие от сперматогенеза блок мейоза на стадии метафазы I является обязательным компонентом оогенеза у большинства животных и у человека (см. главу 1). Утрата в оогенезе и на первых делениях дробления зиготы механизмов селекции, свойственных делящимся соматическим клеткам и сперматоцитам, по всей видимости, и является причиной высокой частоты анеуплоидии в ооцитах и ранних эмбрионах человека [489, 549] (см главу 5).

3.2.4. Мозаицизм хромосом

Мозаицизм хромосом возникает на доимплантационных стадиях развития вследствие нерасхождения хромосом при дроблении blastомеров. По своему генезу мозаицизм подразделяется на митотический и мейотический.

- *Митотический мозаицизм* возникает вследствие нерасхождения хромосом при дроблении нормальной диплоидной зиготы и сопровождается образованием клона трисомных клеток (все моносомные клетки, за исключением 45,X нежизнеспособны

и быстро элиминируются) с удвоенной материнской или отцовской хромосомой.

- *Мейотический мозаицизм* возникает вследствие утраты лишней хромосомы из трисомной зиготы, возникшей вследствие ошибочной сегрегации хромосом в мейозе. При этом формируется диплоидный клон клеток и сохраняется клон клеток с трисомией.

Размеры анеуплоидного клона клеток и его локализация в тканях эмбриона зависят от того, на какой стадии развития произошло нерасхождение хромосом, какова жизнеспособность и пролиферативные потенции клона клеток с аномальным кариотипом.

Мозаичные варианты триплоидии возникают сходным образом при дроблении полиплоидной зиготы. Подробнее механизмы возникновения мозаичных форм геномных мутаций рассмотрены в обзоре [90].

Нерасхождение хромосом чаще происходит в клетках, дающих начало провизорным органам (хорион, плацента). Именно в этих органах формируются и длительное время сохраняются клоны с трисомией, тогда как в клетках самого эмбриона обнаруживается нормальный диплоидный кариотип. Такой *ограниченный плацентой мозаицизм (ОПМ)* относительно часто встречается при кариотипировании зародышей с целью пренатальной диагностики (2% всех диагностик). Учитывая большую практическую значимость ОПМ, мы вернемся к его более подробному рассмотрению в главе 7.

3.2.5. Однородительская дисомия

В случае мейотического варианта мозаицизма (см. выше) возможна потеря единственной хромосомы одного родителя при сохранении двух гомологов от другого, то есть *однородительская дисомия (ОРД)*.

Если при этом гамета, привнесшая лишнюю хромосому в зиготу, возникла в результате ошибок сегрегации хромосом в 1-м делении мейоза, то сохранившиеся в зародыше гомологи одного родителя будут генетически различны (отсюда — *гетерологичная ОРД*).

Однако, если нерасхождение произошло во 2-м мейотическом делении, то оба гомолога будут генетически тождественны (*изодисомия*). Изодисомия возникает также и в случае аномальной сегрегации хромосом при первых делениях дробления зиготы (*постзиготический*

митотический мозаицизм). Ошибки сегрегации лишней хромосомы могут иметь место уже при первом делении дробления. В этом случае ОРД будет представлена во всех клетках зародыша, то есть будет *истинной (полной)* ОРД. Подробнее механизмы возникновения у плода ОРД, которая в большинстве случаев сопровождается плацентарным мозаицизмом, рассмотрены в главе 7.

3.3. Механизмы возникновения хромосомных мутаций

В подавляющем большинстве случаев структурные хромосомные мутации передаются потомству одним из родителей, в кариотипе которого присутствует сбалансированная хромосомная перестройка, то есть являются частью сегрегационного генетического груза. Наличие в кариотипе родителей сбалансированных хромосомных перестроек (транслокации, инверсии) неминуемо сопряжено с нарушениями сегрегации соответствующих хромосом в мейозе, следствием чего является закономерное возникновение генетически несбалансированных гамет и, соответственно, появление зародышей с делециями и дупликациями соответствующих сегментов аберрантных хромосом. Частота возникновения генетически неполноценных гамет зависит от типа хромосомных перестроек, пола носителя и некоторых других факторов, более подробно рассмотренных в главах 4 и 6.

Значительно реже структурные aberrации возникают *de novo* в гаметогенезе, либо в клетках зародыша (мутационный генетический груз). В последнем случае они могут быть представлены мозаичной формой.

Основным механизмом возникновения структурной перестройки любого типа является наличие разрывов в одной или нескольких хромосомах с последующим воссоединением образовавшихся фрагментов.

Разрывы могут возникать в интерфазном ядре как до, так и после репликации ДНК. В результате разрыва, возникшего до репликации (в периоде G1), поврежденными оказываются обе хроматиды метафазной хромосомы (хромосомный, или изохроматидный, разрыв), в фазе S или после репликации — только одна хроматида (хроматидный разрыв).

Единичный хромосомный разрыв, не затрагивающий центромеры, приводит к появлению делетированной хромосомы и фрагмента,

который, будучи ацентрическим (лишенным центромеры), обычно утрачивается в следующем делении клетки. При наличии двух точек разрыва происходит либо восстановление (репарация) целостности хромосомы, либо образование различных типов перестроек, как внутривнутрихромосомных (если разрывы локализованы в одной хромосоме), так и межхромосомных (при наличии разрывов в разных, гомологичных и негомологичных, хромосомах).

При воссоединении точек разрыва, локализованных в одной хромосоме, может происходить утрата участка хромосомы — *делеция* (рис. 3.3). Следует отметить, что наличие двух точек разрыва необходимо при образовании интерстициальной делеции, то есть утраты внутреннего сегмента. Для образования концевой, или терминальной, делеции (утраты дистального участка хромосомы) достаточно одного разрыва.

Воссоединение двух точек разрыва в той же хромосоме может происходить с разворотом «вырезанного» участка на 180° (*инверсии*) (рис. 3.4).

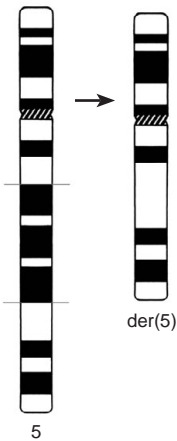


Рис. 3.3. Образование интерстициальной делеции $del(5)(q14-q23)$

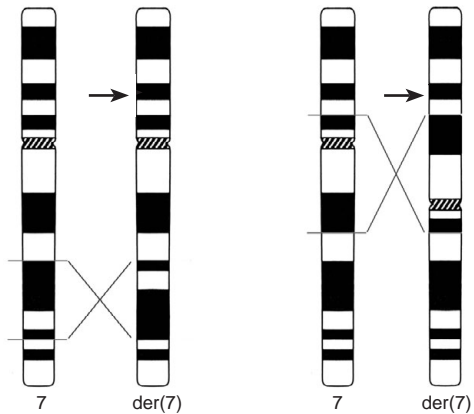


Рис. 3.4. Образование инверсии: слева — парацентрическая инверсия $inv(7)(q31q33)$, справа — перичентрическая инверсия $inv(7)(p12q21)$

Для образования *инсерции* (встраивание между точками разрыва участка другой хромосомы) необходимо наличие трех разрывов — один разрыв на хромосоме-«реципиенте» и два других — для образования участка-«донора». Инсерция может осложняться инверсией «донорского» участка (рис. 3.5).

При образовании *дупликации* воссоединение точек разрыва сопровождается удвоением какого-либо участка хромосомы. Если удвоенные участки располагаются последовательно, то такая дупликация называется *тандемной*, если с разворотом на 180° — *инвертированной* (рис. 3.6).

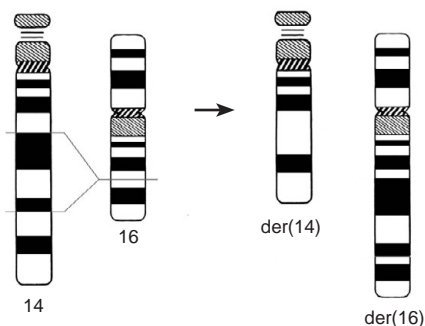


Рис. 3.5. Образование инсерции *der(16)* вследствие межхромосомной перестройки. Хромосома-«реципиент» — прямая инсерция *dir ins(16;14)(q22;q21q23)*. Второй продукт перестройки (хромосома-«донор») — *del(14)(q21q23)*

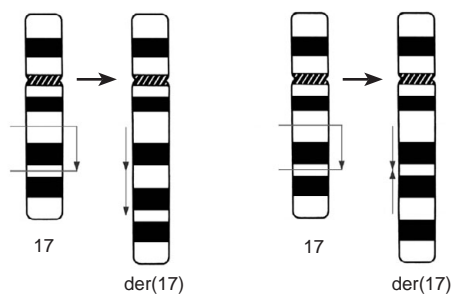


Рис.3.6. Образование дупликации. Слева — тандемная дупликация *dip(17)(q21q23)*, справа — инвертированная дупликация *dip(17)(q23q21)*

Если утрачиваются оба теломерных участка одной хромосомы, то воссоединение открытых концов сопровождается образованием кольца. Судьба кольцевой хромосомы может быть различна (рис. 3.7).

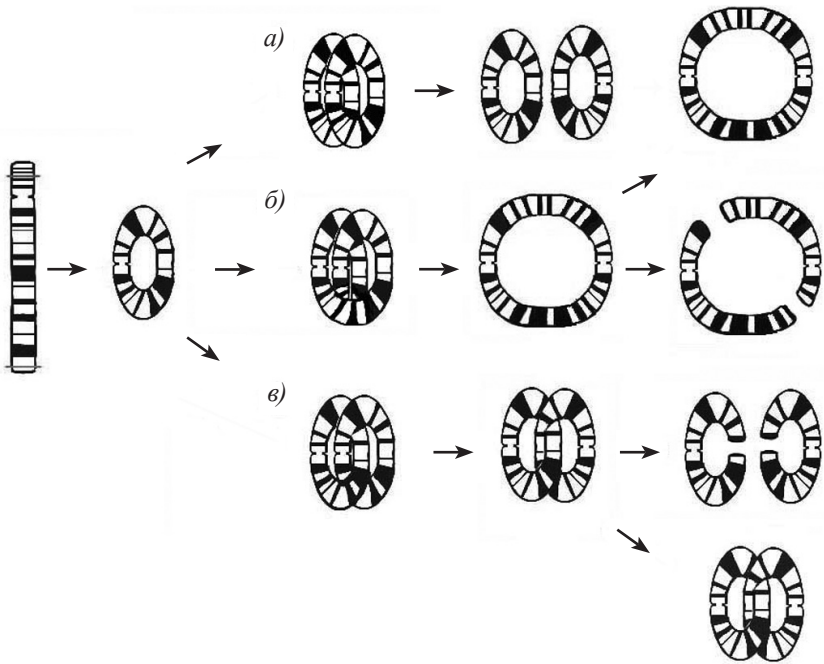


Рис. 3.7. Образование кольцевой хромосомы и сценарии ее судьбы в зависимости от особенностей репликации [187]. При нормальной репликации (а) образуется 2 моноцентрических кольца (*r*); при одном обмене (или нечетном числе обменов) между сестринскими хроматидами (б) — большое дицентрическое (*dicr*) кольцо; при двух обменах (или их четном числе) (в) — 2 «сцепленных» моноцентрических кольца. Отдельные моноцентрические хромосомы сегрегируют в дочерние клетки без затруднений. Дицентрические и сцепленные моноцентрические кольца в анафазе обычно разрушаются и либо утрачиваются, либо видоизменяются в зависимости от вариантов воссоединения новых точек разрыва и репликации в следующем клеточном цикле

Если разрывы затрагивают разные хромосомы, то обмен фрагментами возможен двояким образом (рис. 3.8, 3.9). В случае сохранения центромеры в каждой из перестроенных хромосом, их сегрегация в митозе происходит без каких-либо затруднений (рис. 3.8). Однако возможно образование двух ацентрических фрагментов и дицентрической хромосомы, судьба которой определяется особенностями поведения в анафазе (рис. 3.9).

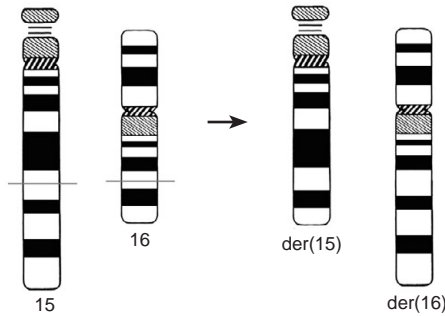


Рис. 3.8. Образование реципрокной транслокации $t(15;16)(q22;q22)(15pter \rightarrow 15q22::16q22 \rightarrow 16qter; 16pter \rightarrow 16q22::15q22 \rightarrow 15qter)$

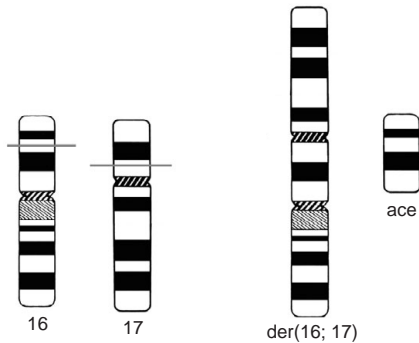


Рис. 3.9. Образование дицентрической хромосомы $dic(16;17)(p13.1;p11.2)$ и ацентрического фрагмента

Для объяснения возникновения изохромосом можно предположить два механизма (рис. 3.10).

- Первый механизм — удвоение плеча одной хромосомы (длинного или короткого) вследствие аномального (поперечного) разделения центромеры.
- Второй механизм предполагает образование изохроматидного разрыва в прицентромерном районе, в результате которого возникают два центрических фрагмента, с последующим восстановлением дуплечей хромосомы из одного плеча и утратой второго плеча.

В определенном смысле изохромосома представляет собой гигантскую инвертированную дупликацию размером с целое плечо и делецию другого плеча. Возникающие вследствие этих внутривитрических перестроек изохромосомы являются истинными, так как оба плеча генетически идентичны. Именно этот способ образования изохромосомы считается наиболее распространенным.

В случае межхромосомной перестройки, то есть обмена между идентичными плечами гомологичных хромосом в центромерном районе (или разрыва в центромерах двух гомологичных хромосом с воссоединением двух одинаковых плеч по типу центрического слияния) возникает хромосома, которая морфологически не отличается от изохромосомы, однако ее плечи не являются генетически идентичными (рис. 3.11).

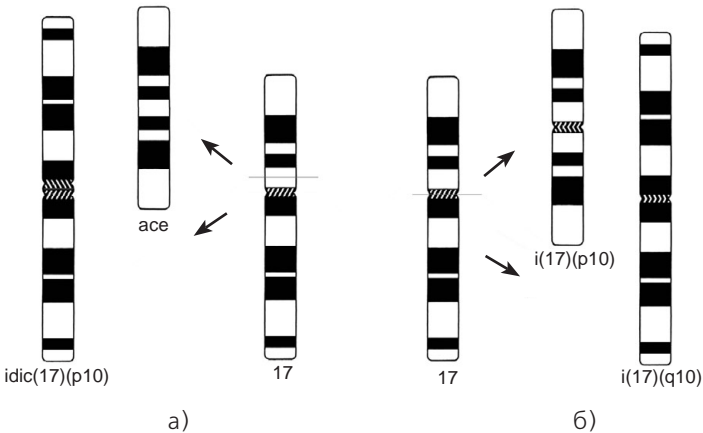


Рис. 3.10. Образование изохромосомы путем изохроматидного разрыва (а) или поперечного деления центромеры (б)

Большинство изохромосом оказываются дицентрическими, однако функции кинетохора выполняет лишь одна центромера, тогда как вторая оказывается репрессированной.

Образование изохромосом может быть результатом митотической рекомбинации, но чаще происходит в гаметогенезе и затрагивает X-хромосому. Если aberrантная X-хромосома имеет отцовское происхождение, то единственным механизмом ее возникновения может быть слияние генетически идентичных сестринских хроматид. Если изохромосома X имеет материнское происхождение, то в ее формировании могут принимать участие как одна, так и две X-хромосомы. В первом случае механизм образования изохромосомы сходен с таковым в сперматогенезе, во втором случае нельзя исключить транслокацию или хроматидный обмен между гомологичными хромосомами.

Сложности в определении механизма образования aberrации представляют и аутомсомные изохромосомы. Установить природу aberrации (изохромосома или межхромосомный обмен) принципиально возможно молекулярными методами с использованием высокополиморфных маркеров. Истинная изохромосома будет гомозиготна по всем локусам обоих плеч, тогда как гетерозиготность будет свидетельствовать о вовлечении двух хромосом в образование изохромосомы.

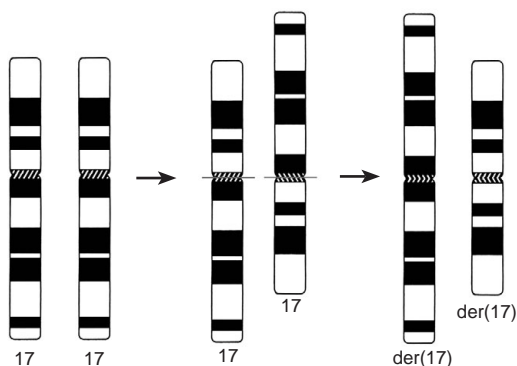


Рис. 3.11. Обмен одноименными плечами гомологичных хромосом в районе центромеры. Образующиеся продукты транслокации морфологически не отличаются от изохромосомы

Разрывы в центромерных районах, сопровождающиеся обмeнами между целыми плечами разных хромосом или приводящие к разъединению двуплечей хромосомы на две акроцентрические — достаточно редкие события. Значительно чаще обмены в районе центromеры затрагивают акроцентрические хромосомы и приводят к их центрическому слиянию — Робертсоновской транслокации, названной так по имени автора У. Робертсона, впервые описавшего этот вид хромосомных перестроек у некоторых видов прямокрылых в 1916 году. Возникшая вследствие слияния двух акроцентриков метацентрическая или субметацентрическая хромосома обычно имеет одну центромeру, реже — две. В последнем случае одна из центромeр может быть неактивной (рис. 3.12).

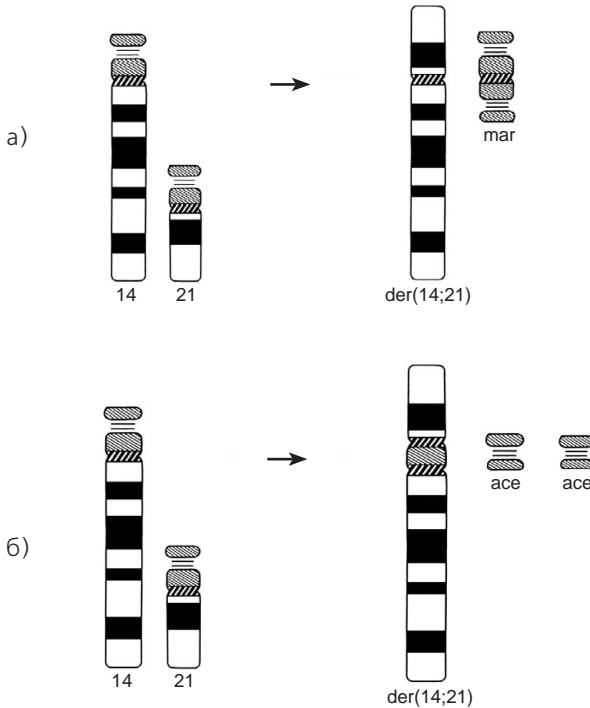


Рис. 3.12. Центрическое слияние (образование Робертсоновской транслокации) с сохранением одной (а) или двух (б) центромeр

Короткие плечи акроцентриков могут сливаться с образованием моноили дицентрической маркерной хромосомы. Иногда утрачивается лишь одно короткое плечо, а второе представлено отдельной мелкой маркерной хромосомой. Оба коротких плеча в виде маркерной хромосомы сохраняются реже. Чаще короткие плечи обоих акроцентриков теряются, поэтому число хромосом у гетерозиготного носителя Робертсоновской транслокации становится на единицу меньше. При этом, однако, учитывая положение точек разрывов в околоцентромерных районах обеих хромосом, реальной утраты генетического материала не происходит.

В центрических слияниях равновероятно могут участвовать все пять пар акроцентрических аутосом. Между тем, отдельные хромосомы групп D и G вовлечены в образование Робертсоновских транслокаций не случайно. Это подтверждается данными о частоте носителей транслокаций D/D, D/G, G/G среди новорожденных (табл. 3.1). Наиболее часто в образовании Робертсоновских транслокаций принимают участие хромосомы 14, 13 и 21.

Таблица 3.1. Частота гетерозиготных носителей центрических слияний разных акроцентрических хромосом [187]

Хромосомы	13	14	15	21	22	Всего
13		101	8	10	6	125
14			8	45	3	56
15				17	3	20
21					17	17
22						
Всего		101	16	72	29	218

Как уже отмечалось, дицентрические хромосомы и кольца с двумя функциональными центромерами обычно нарушают деления клетки. Подавляющее большинство хроматидных разрывов и обменов, возникающих после репликации ДНК, также элиминируются в следующем митозе. Некоторые aberrантные хромосомы принимают участие в образовании специфических структур — микроядер. Микроядерный тест, а также учет мостов и фрагментов в анафазе и хромосомных и хроматидных разрывов и фрагментов в метафазе широко используется при оценке влияния мутагенных факторов на соматические клетки.

Более стабильными являются внутри- и межхромосомные перестройки с сохранением функций одной центромеры. Именно такие хромосомные aberrации совместимы с развитием и живорождением и

сравнительно часто регистрируются при пренатальном и постнатальном кариотипировании.

Следует отметить, что точки разрыва могут быть локализованы практически в любом участке любой хромосомы, однако, частота их возникновения в разных сегментах варьирует. Кроме того, типы перестроек для отдельных хромосом проявляют определенную специфику.

Так, для акроцентрических хромосом наиболее характерны центрические слияния (см. выше).

Высокоспецифичной реципрокной транслокацией является Филадельфийская хромосома (аббревиатура Ph или Ph¹) — продукт транслокации хромосом 9 и 22 — $der(22)t(9;22)(q34;q11)$, которая закономерно возникает при хроническом миелолейкозе.

Среди aberrантных X-хромосом лидируют изохромосомы по длинному плечу и кольцевые X-хромосомы, которые клинически проявляются синдромом Шерешевского–Тернера.

Из аномалий хромосомы 18 наиболее часто встречаются изохромосомы по короткому плечу и кольцевые хромосомы. Каждая из перестроек сопровождается очерченной клинической картиной. Это позволило выделить их в отдельные синдромы, получившие название по типу хромосомной aberrации — синдром $i(18p)$ и синдром $r(18)$.

Подавляющее большинство других типов перестроек (делеций, дупликаций, инверсий, инсерций и реципрокных транслокаций) характеризуются уникальностью точек разрыва и повторяемостью только в пределах одной родословной. В качестве исключения из этого правила можно привести относительно частые спорадические случаи делеций и дупликаций, которые по характерной симптоматике выделены в отдельные синдромы. Так, известны *делеционные синдромы*:

- короткого плеча хромосомы 4 (синдром Вольфа–Хиршхорна);
- короткого плеча хромосомы 5 (синдром «крика кошки»);
- короткого плеча хромосомы 9 (синдром Альфи), иногда в форме изохромосомы 9 по длинному плечу;
- длинного плеча хромосомы 13 (синдром Орбели);
- короткого и длинного плеч хромосомы 18 (синдромы $18p-$ и $18q-$ соответственно);
- длинного плеча хромосомы 21 (синдром $21q-$);
- длинного плеча хромосомы 22 (синдром $22q-$).

Делеции 13q-, 21q- и 22q- часто приводят к образованию кольцевых хромосом, поэтому их иногда обозначают синдромами кольцевых хромосом 13, 21 и 22.

К разряду «синдромальных» относятся и дупликации сегментов некоторых хромосом:

- короткого плеча хромосомы 9 (синдром 9p+);
- длинного плеча хромосомы 14 (синдром 14q+).

Следует отметить также нозологические формы (всего около 20), обусловленные микроперестройками (делециями и дупликациями). Наиболее известные из них:

- синдромы Прадера–Вилли или Ангельмана в зависимости от родительского происхождения микроделеции в импринтированном районе 15q11-q13;
- синдром Видемана–Беквита (дупликация сегмента 11p15);
- синдром Лангера–Гидеона (микроделеция 8q24.11-q24.13);
- ретинобластома (микроделеция 13q14);
- Миллера–Диккера (микроделеция 17p13.3);
- синдром Вильямса (микроделеции 7q11 и реже — 11q13-q14; 22q-);
- синдром ДиДжорджи (микроделеция 22q11).

Заключение

В главе рассмотрены основные типы хромосомных перестроек, механизмы их возникновения на уровне всего генома, отдельных хромосом и их сегментов, затронута проблема презиготической селекции гамет. Отмечено, что хромосомные перестройки представляют собой обширный и гетерогенный класс мутаций.

Численные нарушения на уровне генома и целых хромосом возникают обычно в митозе и в мейозе, а также могут быть результатом нерасхождения хромосом на начальных стадиях дробления оплодотворенной яйцеклетки. Механизмы возникновения структурных хромосомных перестроек более многообразны и полиморфны. Обычно первым этапом их возникновения являются хроматидные разрывы, индуцированные мутагенами. Если эти повреждения ДНК не репарируются при следующем раунде репликации, возникают хромосомные разрывы, которые посредством рекомбинационного механизма

приводят к образованию внутри- или межхромосомных перестроек. При этом ошибки рекомбинации более характерны для мейоза, в котором обмены участками ДНК между бивалентами являются обязательными компонентами нормального процесса созревания гамет, в то время как митотический кроссинговер происходит существенно реже. Частота и спектр хромосомных мутаций в значительной степени определяются спецификой затронутых перестройкой сегментов, в частности, локус- и хромосом-специфичностью, а также другими факторами. Подробнее эти аспекты будут рассмотрены в главах 4, 5 и 6.

ГЛАВА 4

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ В ГАМЕТОГЕНЕЗЕ И ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Введение

При всем многообразии хромосомных аномалий их распределение в онтогенезе характеризуется определенной специфичностью. Так, для гаметогенеза характерны численные и структурные нарушения кариотипа. При этом хромосомные аномалии, возникающие в оогенезе, качественно и количественно отличаются от таковых в сперматогенезе. Аномалии, связанные с нарушением ploидности (триплоидия), возникают преимущественно при оплодотворении, тогда как для ранних стадий дробления более характерны мозаицизм хромосом и однородительская дисомия. Причины такой «преференции» хромосомных аномалий, а также основные подходы, которые используются в настоящее время для исследования хромосом в гаметогенезе и в эмбриогенезе человека, кратко рассмотрены в данной главе.

Одна из основных задач цитогенетики развития — определить характер аномалий кариотипа, установить возможные пути их происхождения и попытаться выяснить каким образом дисбаланс целых хромосом или их фрагментов влияет на процессы раннего онтогенеза [380].

Вскоре после того как Т. С. Тjjo и А. Levan в 1956 году установили точное число хромосом в кариотипе человека, равное 46, J. Leijer в 1959 году обнаружил, что причиной широко распространенной болезни, описанной еще в 1876 году L. Down и впоследствии названной его именем (синдром Дауна), является трисомия 21. В дальнейшем была установлена хромосомная природа многих других синдромов [31, 125, 134, 187]. В 1960–1970-е годы была выполнена большая серия цитогенетических исследований на спонтанно абортированных заро-

дышах человека, однозначно доказавшая решающую роль хромосомного дисбаланса в патологии ранних стадий развития человека [91, 93, 268, 282]. Эти исследования, однако, позволили получить лишь сугубо общую, ориентировочную информацию о роли отдельных хромосом и их фрагментов в эмбриогенезе человека.

Прогресс в области прямых неинвазивных (ультразвуковое сканирование) методов исследования эмбриона человека, инвазивных (хирургических) методов получения образцов плодного материала, появление высокоразрешающих методов дифференциальной окраски хромосом, а также методов молекулярной цитогенетики открыли принципиально новые возможности для исследований проблем цитогенетики эмбрионального развития человека.

4.1. Общие представления о цитогенетике гаметогенеза

Процесс созревания половых клеток (гаметогенез) особенно привлекателен для цитогенетических исследований благодаря наличию целой серии митотических делений, мейотической рекомбинации и редукционного деления. Эмбриологические и некоторые цитологические основы гаметогенеза у человека были уже рассмотрены (см. главу 1). Здесь представляется уместным обратить внимание читателя на цитогенетическое своеобразие сперматогенеза и оогенеза. Принципиальная схема гаметогенеза у человека представлена на рисунке 1.1.

Решающим этапом гаметогенеза является процесс мейоза, во время которого происходят такие кардинальные для биологии развития процессы как *спаривание (конъюгация)* гомологичных хромосом с образованием *синаптонемного комплекса, рекомбинация* генетического материала гомологов путем взаимного обмена идентичными хромосомными сегментами (*кроссинговер*), цитологическим проявлением которого являются *хиазмы*. Все эти процессы происходят в профазе I мейоза, в которой различают такие цитологические подстадии как *лептотена, зиготена, пахитена, диплотена и диакинез*. Затем следует *метафаза I* с образованием сперматоцита или ооцита 2-го порядка и *метафаза II* с образованием гаплоидных сперматид в мужском мейозе или выделением 2-го полярного тельца и образованием пронуклеусов

уже в оплодотворенной яйцеклетке при завершении женского мейоза. Подробно с процессами мейоза у млекопитающих и человека можно ознакомиться в соответствующих монографиях, учебниках и руководствах [52, 54, 187, 871].

Следовательно, основные события, связанные с процессом мейоза, в мужских гаметах происходят уже после полового созревания. Женский мейоз начинается еще внутриутробно. Его важнейшая стадия — профазы, в которой происходят конъюгация и рекомбинация, имеет место в гонадах плодов женского пола на 3–4-м месяцах развития (см. главу 1).

Другие особенности созревания мужских и женских гамет кратко сводятся к следующим.

Сперматогенез устанавливается в период полового созревания и продолжается непрерывно до старости. Оогенез начинается у эмбрионов ранних стадий развития, возобновляется в период полового созревания; происходит асинхронно, циклично и полностью завершается только после оплодотворения.

Длительность волны сперматогенеза у человека составляет 72 ± 5 дней; общая продолжительность оогенеза исчисляется десятилетиями.

Из одного сперматоцита I формируются четыре сперматозоида. Продукты мейоза в оогенезе неравноценны — каждый ооцит I дает начало только одной зрелой яйцеклетке, а три гаплоидных набора удаляются в составе двух полярных телец.

Эти отличия гаметогенеза отражаются и на методах, которые используются для детекции хромосомных аномалий в ооцитах и сперматоцитах человека с целью выяснения механизмов нерасхождения хромосом в женском и мужском мейозе.

Ооциты млекопитающих — одни из наиболее долгоживущих клеток организма — характеризуются длительным, прерывистым мейозом. Так как мейотическая S-фаза и начало профазы I в ооцитах происходят в эмбриональном периоде, для анализа процессов конъюгации необходимо использовать эмбрионы. Анализ рекомбинации гомологичных хромосом (*хиазмообразование*), напротив, возможен у взрослых, когда ооциты после длительного периода покоя — стадии *диктиотены* (см. главу 1), выходят из антральных фолликулов и возобновляют мейоз.

У мужчин благодаря непрерывной спермопродукции после наступ-

ления половой зрелости все стадии сперматогенеза доступны для исследования на протяжении всей жизни.

Для анализа возникновения хромосомных и геномных мутаций в мейозе млекопитающих, в том числе и человека, обычно используют подходы, которые стратегически можно разделить на три группы [396]:

- цитогенетический анализ хромосомного комплекта в сперматоцитах и сперматозоидах;
- цитогенетический анализ ооцитов на стадии метафазы II деления мейоза или активированных ооцитов, завершивших второе деление мейоза, то есть после отделения 2-го полярного тельца;
- регистрация аномалий у эмбриона, плода или новорожденного.

Как правило, исследования механизмов происхождения хромосомной аномалии ограничиваются одним, большей частью последним, из вышеперечисленных подходов.

4.2. Методы исследования сперматогенеза

Нарушения сперматогенеза и спермиогенеза (см. главу 1) сопровождаются частичным или полным бесплодием и являются причиной 2/3 бесплодных браков [257]. Эта проблема давно привлекает внимание специалистов в области репродуктивной медицины, однако до сих пор продолжается поиск причин, приводящих к мужскому бесплодию.

За последние годы стало очевидно, что многие формы нарушения фертильности обусловлены генетическими факторами. Так, хромосомные аберрации, делеции Y-хромосомы и некоторые моногенные болезни являются причиной 20–30 % мужского бесплодия и нарушений сперматогенеза [257, 289, 366].

Точная диагностика причин нарушения мужской фертильности в настоящее время приобретает особое значение, поскольку вспомогательные репродуктивные технологии позволяют преодолеть многие формы мужского бесплодия, что, несомненно, увеличивает риск передачи потомству целого ряда наследственных болезней. С другой стороны, очевидно, что установление причины бесплодия способствует выбору оптимальной тактики лечения мужского бесплодия, что повышает эффективность работы центров репродукции.

В настоящей главе основное внимание сосредоточено на характе-

ристике цитогенетических подходов, которые применяются для анализа сперматогенеза и в сочетании с молекулярно-генетическими методами используются для диагностики его нарушений.

Доступность для прижизненного анализа тканей семенников у мужчин строго ограничена медицинскими показаниями, такими как стерилизация путем кастрации или биопсия яичка у пациентов с нарушениями половой дифференцировки или с бесплодием. В последние годы, благодаря бурному развитию методов вспомогательной репродукции при лечении мужского бесплодия, оперативные вмешательства ограничиваются аспирационной пункцией тканей яичка или его придатка.

Препараты из биоптатов семенников пригодны для анализа хромосом на любых стадиях сперматогенеза — от сперматогониев до зрелых сперматозоидов. Материал, получаемый при пункции придатка (*эпидидимиса*), менее привлекателен для цитогенетических исследований профазы мейоза, поскольку концентрация клеток, находящихся на начальных стадиях сперматогенеза, как правило, крайне низка и практически соответствует таковой в эякуляте. При нормальном сперматогенезе доля сперматоцитов на стадиях мейоза (*мейоцитов*) в эякуляте составляет не более 3–4% [805]. У пациентов с репродуктивными проблемами количественный и качественный состав эякулированных сперматоцитов может меняться, в целом отражая общую картину сперматогенеза [95, 141, 179]. Очевидно, что анализ эякулированных мейоцитов, исключая хирургическое вмешательство, перспективен для анализа причин аномалий сперматогенеза и может найти широкое применение.

Таким образом, существуют реальные возможности получения материала для цитогенетических исследований сперматогенеза у человека в норме и при различных формах мужского бесплодия.

4.2.1. Цитологические методы

4.2.1.1. Спермограмма

Традиционно оценка особенностей сперматогенеза проводится при помощи спермограммы. Согласно рекомендациям ВОЗ [890], спермограмма должна учитывать следующие критерии: концентрацию сперматозоидов в 1 мл эякулята, соотношение живых/мертвых, подвижных/неподвижных, морфологически нормальных/аномальных сперматозоидов; наличие незрелых половых клеток. Разработаны

критерии оценки морфологии сперматозоидов [808, 890]. Спермограмма позволяет косвенно судить о состоянии сперматогенеза на основании морфологических показателей заключительных этапов этого сложного и длительного процесса.

4.2.1.2. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток

Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток (ККАНПК) является одним из наиболее доступных методов анализа состояния сперматогенеза. Метод основан на определении числа клеток, находящихся на разных стадиях сперматогенеза, путем их подсчета на цитогенетических препаратах из биоптатов семенников или эякулята человека [95]. В отличие от традиционной спермограммы, ККАНПК позволяет более детально проанализировать состояние сперматогенеза, так как предполагает идентификацию всех его стадий, как мейотических, так и пре- и постмейотических. Изменение соотношения клеток сперматогенного ряда позволяет определить стадии деления или дифференцировки клеток, на которых сперматогенез оказывается заблокирован. Информативность метода ККАНПК доказана при исследовании эякулятов в группах пациентов с нарушениями сперматогенеза различной этиологии [141]. К недостаткам метода можно отнести затруднения при идентификации клеток по стадиям развития вследствие дегенерации большей части эякулированных клеток сперматогенного ряда.

В лаборатории пренатальной диагностики НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН ККАНПК проводят на суховоздушных препаратах из нативного эякулята после окрашивания флуорохромом Hoechst 33258 [89]. Идентификацию стадий и подсчет клеток осуществляют согласно схеме [141]. Определяют долю клеток каждой стадии от общего числа НПК. При подсчете выделяют сперматоциты на стадии *предпахитенного* этапа развития (клетки на стадиях *прелептотены*, *лептотены* и *зиготены*), *пахитены*, *диплотены* — *диакинеза*, *метафазы I* и *II*, *сперматоциты 2-го* порядка и *сперматиды*. В отдельную группу объединяют клетки, идентификация которых была невозможна (X-клетки) (рис. 4.1).

Несмотря на выраженные межиндивидуальные различия в соотношении НПК, отмечаются некоторые общие тенденции в разных группах пациентов (табл. 4.1). Так, при *астенозооспермии* и *астено-*

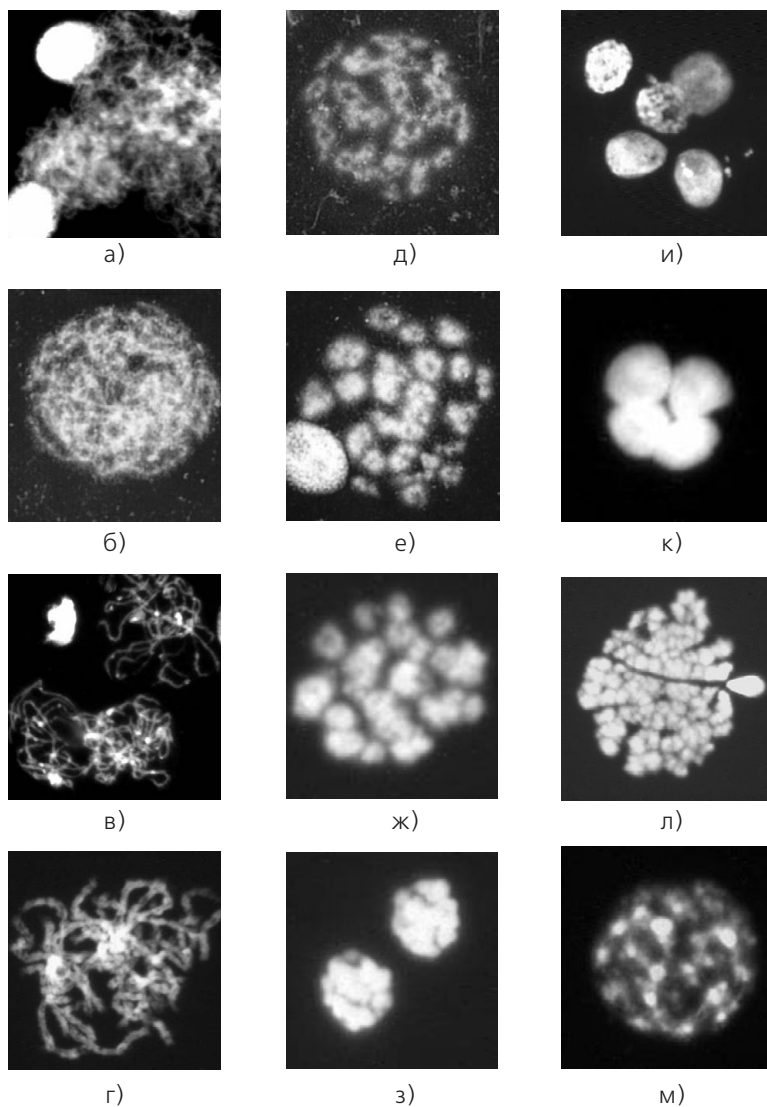


Рис. 4.1. Клетки сперматогенного ряда: а — прелептотена, б — лептотена, в — зиготена, г — пахитена, д — диплотена, е — диакинез, ж — метафаза, з — сперматоциты II порядка, и — сперматоциты II порядка и сперматиды, к — нераззошедшиеся сперматиды, л, м — деградирующие клетки сперматогенного ряда (X-клетки). Препараты из образцов эякулята от пациентов с азооспермией. Окраска QFH/AcD

тератозооспермии выявляется частичный блок сперматогенеза на предпахитенных стадиях и отмечается снижение числа сперматоцитов 2 и сперматид. При астенотератозооспермии доля незрелых половых клеток в несколько раз выше нормы.

При *олигоастенозооспермии* наблюдается увеличение количества сперматоцитов 2-го порядка, что свидетельствует о нарушениях созревания гамет на более поздних стадиях сперматогенеза. При *азооспермии* незрелые клетки выявляются в следовых количествах, встречаются эпителиальные клетки и лейкоциты, наличие которых указывает на воспалительные и дегенеративные процессы в семенных канальцах.

Особый интерес представляют данные о количественном и качественном составе незрелых половых клеток в эякулятах у пациентов с хромосомными аномалиями. Так, в проведенном нами исследовании [185] в эякулятах у пациентов с аномальным кариотипом доля незрелых клеток варьировала от 11,3 до 100%, что многократно превышало контрольные значения (1,5%). Увеличение незрелых форм половых клеток происходило на фоне массовой гибели клеток, особенно ярко выраженной при

Таблица 4.1. Соотношение клеточных элементов эякулята (%) в группах пациентов с нарушениями сперматогенеза

Стадии сперматогенеза	Пациенты				Норма*
	Астенозооспермия (N = 9)	Астенотератозооспермия (N = 6)	Олигоастенозооспермия (N = 6)	Азооспермия (N = 5)	
До пахитены	4,03 ± 0,153	5,22 ± 0,454	1,07 ± 0,289	0,43 ± 0,167	0,66
Пахитена	0 ± 0	0,28 ± 0,016	0,49 ± 0,162	0,54 ± 0,0153	0,45
Диплотена — диакинез	2,58 ± 0,04	4,98 ± 0,607	3,12 ± 0,628	0,07 ± 0,029	1,11
Метафаза I и II	0 ± 0	0,34 ± 0,07	0,05 ± 0,004	0,67 ± 0,205	0,04
Сперматоциты 2 и сперматиды	54,26 ± 4,646	32,66 ± 3,358	65,93 ± 4,962	28,34 ± 5,226	68,0
Неразошедшиеся сперматиды	24,78 ± 3,531	37,92 ± 2,583	27,43 ± 3,609	14,67 ± 5,169	22,9
X-клетки	11,54 ± 1,709	14,23 ± 1,265	1,97 ± 0,752	17,11 ± 1,372	5,85
Эпителиальные клетки	2,66 ± 0,826	5,00 ± 0,752	0,27 ± 0,166	5,00 ± 0,831	—
Лейкоциты	1,78 ± 0,099	1,23 ± 0,074	0,17 ± 0,073	0,09 ± 0,035	—
% незрелых половых клеток	6,37 ± 1,112	10,7 ± 2,134	25,53 ± 3,861	—	2–4

* См. [141] (приведены только средние значения).

численных и структурных аномалиях половых хромосом, включая микроделеции в локусе AZF. При этом у пациентов с полной и мозаичной формой синдрома Клайфельтера (XXY, XX/XXY) наблюдалось относительное повышение доли сперматогониев, а у носителей кариотипов 47,XY^Y/46,XY и 46,X,der(Y) преобладали сперматоциты II и сперматиды, в том числе и с нарушениями кариокинеза. В случае носительства транслокации (9;13), кроме деградирующих клеток доминировали сперматоциты на стадии лептотены — зиготены. Таким образом, численные аномалии половых хромосом сопровождаются увеличением доли сперматогониев, а структурные aberrации аутосом — доли сперматоцитов допахитенных стадий мейоза. Подобные отклонения в соотношении НПК в образцах эякулята от пациентов с нормальным кариотипом 46,XY могут служить косвенным доказательством наличия гонадного мозаицизма.

Соотношение клеток НПК в эякуляте в определенной степени служит показателем продолжительности этих стадий [89, 805]. Доля сперматоцитов, находящихся в профазе I мейоза, длительность которой у человека составляет 3–4 недели [357], обычно не превышает 10% и не зависит от морфофункциональных параметров спермограммы. Исключение составляют носители аутосомных транслокаций и пациенты с *астенотератозоспермией*, в эякуляте которых доля сперматоцитов I-го порядка вдвое превышает аналогичный показатель в других группах. Можно предположить, что к частичному блоку клеток на этих стадиях приводят аномалии конъюгации и синапсиса, а затем и нарушения сегрегации хромосом в первом или во втором делениях мейоза. Однако некоторые сперматоциты, прошедшие первое мейотическое деление, способны завершить мейоз и спермиогенез, о чем свидетельствует наличие сперматозоидов, иногда единичных, в образцах эякулята у всех исследованных нами пациентов.

Связь нарушений формирования головки спермия (*тератоспермия*) и его подвижности (*астеноспермия*) с аномалиями кариотипа, возникающими в мейозе, заслуживает специального исследования. Нами, как и некоторыми другими авторами, отмечена корреляция между хромосомными аномалиями и морфологическими характеристиками сперматозоида [50, 193, 737], однако в других работах такой зависимости не выявлено [304, 502]. К обсуждению этой проблемы мы вернемся в главе 5.

Следует подчеркнуть, что количественный и качественный состав

незрелых половых клеток в эякуляте варьирует у пациентов с различными морфофункциональными параметрами спермограммы и, следовательно, является индивидуальной характеристикой исследуемого образца эякулята. Вместе с тем, для каждой группы пациентов характерен более или менее определенный тип изменений в соотношении клеток сперматогенного ряда, что может быть использовано при диагностике. Детальный анализ эякулированных клеток сперматогенного ряда дает наглядное представление о реальном существовании презиготической селекции мужских гамет и способствует пониманию механизмов ее реализации.

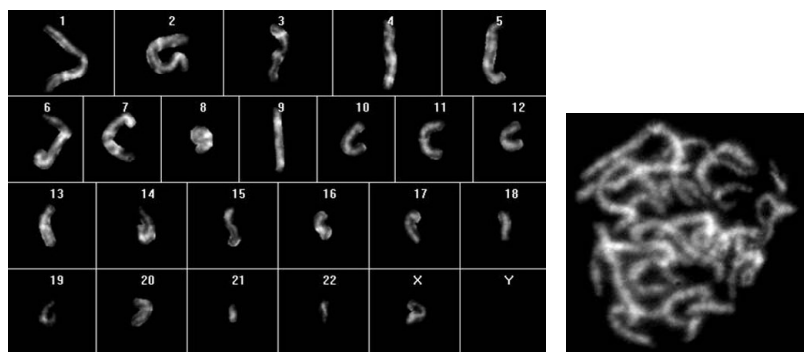
4.2.2. Цитогенетические методы

4.2.2.1. Анализ хромосом сперматоцитов

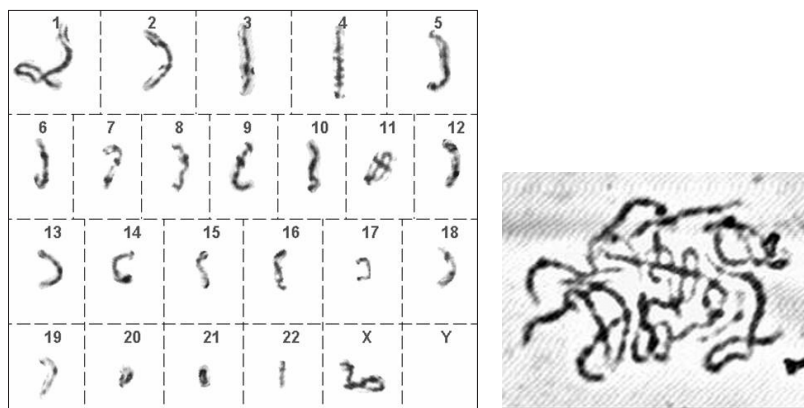
Анализ хромосом сперматоцитов возможен со стадии пахитены. Характерным для пахитены является четко выраженная хромомерная структура хромосом. Число *хромомер* (характерных узелковых утолщений пахитенных хромосом) уменьшается от 499 в ранней пахитене до 386 в средней и поздней пахитене [517]. Хромомерный рисунок большинства бивалентов соответствует G- и Q-рисунку митотических хромосом [585, 875] (рис. 4.2). Это соответствие позволило разработать карту пахитенных хромосом человека [510]. С помощью методов дифференциальной окраски в сперматоцитах возможно четко идентифицировать каждый *бивалент* (конъюгированную пару гомологичных хромосом), обнаружить структурный полиморфизм и незначительные структурные перестройки хромосом [852].

На стадии пахитены могут быть выявлены практически все типы перестроек [189]. Гетерозиготное состояние хромосомных aberrаций сопровождается образованием характерных для каждого типа аномалий конфигураций, тогда как гомозиготные перестройки выявляются лишь в том случае, если они резко изменяют морфологию хромосомы.

Половой (XY) бивалент образует на стадии пахитены так называемый половой пузырек. Однако его детальный анализ на световом уровне затруднителен вследствие конденсированного состояния. Реально исследование полового бивалента возможно только на препаратах *синаттонемного комплекса* — структурного компонента хромосомных бивалентов, формирующегося на стадии ранней пахитены.



а)



б)

Рис.4.2. Хромосомы из сперматозоидов на стадии пахитены: а — эякулированный сперматозоид и кариограмма (окраска QFH/AsD); б — тестикулярный сперматозоид и кариограмма (окраска по Гимза)

В диплотене (стадия двойных нитей) по мере разъединения гомологов в бивалентах визуализируются хиазмы. Характер распределения хиазм по хромосомам и их частота (среднее число хиазм на бивалент и/или ядро) могут быть различны и зависят от многих факторов, в том числе от наличия хромосомных перестроек. Для цитологического анализа удобными считаются диакинез и метафаза I. Биваленты на этой стадии классифицируются по форме, которая определяется размером и морфологией хромосом, числу и положению хиазм [76]. Подсчеты числа уни-, би- и мультивалентов, а также частоты и локализации хиазм являются методами геномного анализа и употребляются при рутинном анализе мейоза [247].

Работы по цитогенетическому анализу сперматоцитов в профазе I мейоза у человека немногочисленны [619, 833]. Это вызвано как ограниченной доступностью материала, так и, отчасти, причинами методического плана. Особенно трудно получить качественные препараты из эякулята. Варьирование условий гипотонической обработки, способов фиксации и методов окраски пока не позволяет решить эту проблему. Частично она может быть преодолена с помощью метода FISH с ДНК-пробами, специфичными для отдельных хромосом или их локусов. Этим методом удается провести идентификацию отдельных бивалентов и проанализировать особенности их поведения в мейозе (рис. 4.3, 4.4)*.

Таким образом, анализ хромосом в профазе I мужского мейоза принципиально возможен, хотя и сопряжен со значительными техническими и методическими трудностями.

4.2.2.2. Анализ синаптонемных комплексов

Непосредственное изучение взаимосвязи процессов конъюгации, распределения хиазм и нерасхождения хромосом предоставляет метод анализа синаптонемных комплексов (СК). Последний является обязательным структурным компонентом бивалентов на стадии пахитены [579, 889].

Согласно современным представлениям, первичная функция СК — обеспечение конъюгации гомологичных хромосом в профазе I, а вторичная — функция матрицы для корректных межхромосомных обменов [469]. Организация мейотической хромосомы в профазе I до сих пор не

* Рисунок на цв. вкл.

изучена и неясно, каким образом СК выполняет свои функции. Тем не менее, СК признается своеобразным скелетом мейотической хромосомы, а его преобразования — отражением поведения гомологов в профазе I мейоза. Особенности формирования осевых элементов СК на стадии лептотены, начало их сближения и синапсиса на стадии зиготены, синапсис и его коррекция на стадии пахитены, а также десинапсис хромосом на стадии диплотены детально изучены [83, 280, 797].

Основной метод анализа СК заключается в распластывании мейотических клеток на поверхности гипотонического раствора с последующим контрастированием структур СК и его анализом при помощи светового или электронного микроскопа. Метод распластывания мейоцитов на поверхности мениска капель сахарозы впервые предложен в 1973 году [335] и пригоден для приготовления препаратов СК из сперматоцитов и ооцитов человека.

Благодаря совпадению морфометрических характеристик большинства СК и соответствующих им метафазных хромосом возможно ранжирование СК в виде идеограмм [797].

Относительные длины и соотношения плеч СК хромосом 1, 9, 16, и 19 у человека отличаются от соответствующих митотических хромосом, в основном, за счет 2–3-кратного укорочения СК в гетерохроматиновых участках пахитенных хромосом [797]. Предполагается, что причина этих изменений обусловлена степенью спирализации [442] и различиями организации хромосом, содержащих крупные прицентромерные гетерохроматиновые блоки, в митозе и мейозе [651].

Относительные длины осевых элементов X- и Y-хромосом, а также соотношение их плеч не пропорциональны аналогичным участкам митотических хромосом. X- и Y-хромосомы конъюгируют частично, формируя СК в дистальных отделах коротких плеч, в псевдоаутосомной области (**PAR**) [274], размеры которого составляют 2,6 миллионов пар нуклеотидов [741]. Морфология XY-бивалента закономерно изменяется на протяжении пахитены, что служит основой для более четкого подразделения ее на 5 подстадий [826]. Высокая степень компактизации и транскрипционной инертности полового бивалента обусловлена механизмом, характерным для инактивации X-хромосомы в соматических клетках [448, 762].

Трудоемкость и необходимость электронной микроскопии для детального анализа СК не позволяют внедрить этот метод в практику медико-генетического обследования мужчин с идиопатическим бесплодием. Вместе с тем, необходимость анализа СК для установления причин нарушения сперматогенеза убедительно доказана в работах отечественных и зарубежных исследователей [83, 205, 206, 561, 615, 796].

Установлено, что асинаптические и десинаптические аномалии СК ассоциированы с увеличением частоты гетероплоидных сперматозоидов [319, 356, 487, 781] и даже с полным блоком сперматогенеза [83, 484, 619, 796]. В зависимости от фенотипического проявления эти мейотические мутации могут быть объединены в три группы [487]:

- 1) «легкие» — наличие унивалентов, которые коррелируют с повышенной частотой дисомий по разным хромосомам;
- 2) «умеренные» — аномалии синапсиса, приводящие к увеличению числа диплоидных сперматозоидов;
- 3) «тяжелые» — полный блок мейоза на стадии первичных сперматоцитов.

Очевидно, что обнаружение мейотических аномалий при анализе СК представляет интерес для поиска специфических факторов, влияющих на ключевые события мейоза. Однако исследование СК человека представляет значительные трудности в связи с незначительным количеством биопсийного материала и гетерогенностью клеточного состава образца. Эти обстоятельства существенно снижают информативность анализа СК, так как ограничены исследованием единичных клеток на стадии пахитены.

4.2.2.3. Анализ хромосомного набора сперматозоидов

Наиболее точной оценкой частоты и спектра хромосомных аномалий, возникающих в мейозе, является исследование хромосомного набора зрелых гамет. Как известно, хроматин в головке сперматозоидов упакован очень плотно, и визуализация отдельных хромосом возможна лишь после оплодотворения. До сих пор не известны способы цитохимической обработки сперматозоидов, которая позволила бы получить в условиях *in vitro* препараты с расправленными хромосомами, пригодными для цитогенетического анализа. Для преодоления этого препятствия используется несколько подходов.

4.2.2.3.1. Метод гетерологичного оплодотворения

Один из объективных методов, позволяющих проводить прямой анализ хромосомного набора единичных сперматозоидов человека, основан на оплодотворении *in vitro* освобожденных от блестящей оболочки яйцеклеток хомячка сперматозоидами человека и последующей визуализации хромосом мужского пронуклеуса [597, 770]. После обработки через 12–14 часов оплодотворенных яйцеклеток колхицином препараты фиксируют [536, 827] и дифференциально окрашивают.

С помощью этого метода удалось установить ряд принципиально важных сведений о частоте и спектре аномалий хромосом в мейозе у здоровых доноров, а также о влиянии различных факторов на сперматогенез. В общей сложности от здоровых доноров в возрасте от 18 до 65 лет проанализировано более 20 тысяч хромосомных комплектов зрелых сперматозоидов [451]. Трудоемкость, высокая себестоимость, необходимость значительных временных затрат существенно лимитируют возможности широкого применения метода гетерологичного оплодотворения. В настоящее время он утратил свою актуальность и используется в ограниченном числе центров.

Новый импульс исследованиям в этом направлении может дать метод микроинъекции сперматозоидов человека в яйцеклетку — метод ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) (рис. 4.5). Разработанный с целью лечения мужского бесплодия этот метод с успехом применяется в настоящее время и для исследования хромосом мужского пронуклеуса после оплодотворения, осуществляемого путем инъекции сперматозоида человека непосредственно в яйцеклетку лабораторной мыши [185, 193, 508]. Метод исключает селекцию спермиев по их оплодотворяющей способности, что повышает вероятность детекции хромосомных аномалий (см. главу 5).

4.2.2.3.2. Метод FISH

Относительно новым прямым методом анализа числовых хромосомных аномалий в зрелых сперматозоидах человека является метод гибридизации *in situ*. Преимущества метода заключаются в скорости анализа и масштабности исследования. Однако его возможности ограничены регистрацией численных aberrаций отдельных хромосом или их локусов, маркированных ДНК-зондами. Попытки изучения струк-

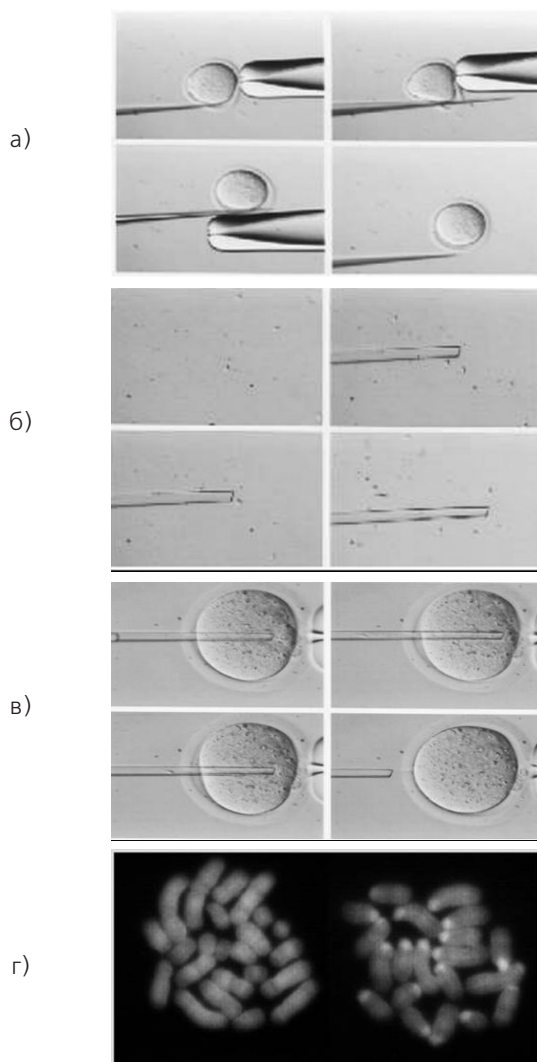


Рис. 4.5. Процедуры микроманипуляции для анализа хромосомного набора сперматозоидов с помощью внутрицитоплазматической инъекции сперматозоида человека в ооциты мыши (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*): а — надрезание блестящей оболочки ооцита мыши, б — иммобилизация сперматозоида, в — инъекция сперматозоида человека в ооцит мыши, г — метафазные хромосомы человека из мужского пронуклеуса (слева) и метафазные хромосомы мыши из женского пронуклеуса (справа) (окраска *QFJ/AcD*)

турных aberrаций были удачными лишь в одном исследовании [864]. Обычно используется мультиплексная (двух-, трехцветная) FISH с прицентромерными ДНК-зондами, которая позволяет отличить истинную дисомию по какой-либо хромосоме от диплоидии [812].

Существенное значение для FISH-анализа сперматозоидов имеют как способы приготовления препаратов (деконденсация хроматина в головке спермия), так и условия проведения гибридизации. Для повышения эффективности гибридизации разработаны различные варианты деконденсации хроматина [407, 475, 617, 621, 791]. Одним из главных требований является сохранность морфологии сперматозоида, включая наличие хвоста после предгибридизационных обработок (рис. 4.6)*. Разработаны также унифицированные критерии оценки гибридизационного сигнала [451, 674].

4.2.3. Молекулярно-генетические методы исследования мужского бесплодия

Геномные и сбалансированные хромосомные aberrации во многих случаях сопровождаются нарушениями спермопродукции, что и является причиной мужского бесплодия. Многочисленные исследования, проведенные в разных странах, показали, что аномалии кариотипа встречаются у 10–15% мужчин с азооспермией, у 5–8% — с олигозооспермией [526]. Причиной азооспермии и олигозооспермии у мужчин с нормальным 46,XY кариотипом могут быть геномные и хромосомные мутации, обусловленные гонадным мозаицизмом (см. главу 6). Очевидно, что отсутствие сперматозоидов или их малочисленность не только в эякуляте, но и пунктатах и биоптатах семенника затрудняет проведение цитогенетических исследований зрелых мужских гамет и зачастую делает их принципиально невозможными. Как уже упоминалось выше, изменение соотношения незрелых клеток сперматогенного ряда в образцах эякулята или пунктата/биоптата семенника может лишь косвенно указывать на наличие хромосомных аномалий в сперматогониях и сперматоцитах, а исследование пахитенных хромосом и синаптонемных комплексов в профазе мейоза относится к разряду эксклюзивных методов анализа. С другой стороны, аномалии кариотипа, как и инфекционные болезни, являются причиной снижения фертильности лишь у части пациентов. Поэтому, учитывая значимость проблемы мужского бесплодия, особенно в случаях предполага-

* Рисунок на цв. вкл.

емого использования единичных сперматозоидов для оплодотворения в программах вспомогательных репродуктивных технологий, представляется целесообразным рассмотреть другие методические подходы, применение которых позволяет установить генетическую природу нарушения репродуктивной функции.

Так, известно, что 7–30% случаев необструктивной азооспермии и тяжелой олигозооспермии обусловлены микроделециями эухроматинового района длинного плеча Y-хромосомы (Yq11) [228, 443, 470, 486, 488, 730, 781, 891]. Впервые зависимость между нарушением сперматогенеза и терминальной делецией длинного плеча Y-хромосомы была продемонстрирована еще в 1976 г. при цитогенетическом исследовании 1160 мужчин с бесплодием [850]. Исследователи высказали предположение, что в дистальном участке Yq11 располагается ген (гены), необходимые для нормального сперматогенеза, так называемый «фактор азооспермии» — AZF. В начале 1990-х годов, благодаря построению подробной физической карты Y-хромосомы на основе ДНК-маркеров, стало возможным проведение рутинного микроделеционного анализа района Yq11 с целью поиска последовательностей ДНК, влияющих на сперматогенез [839, 840]. Последующие работы с применением ПЦР-анализа ДНК позволили обнаружить в участке Yq11 три локуса: AZFa, AZFb и AZFc, делеции которых сопровождаются нарушениями сперматогенеза различной степени тяжести [488]. В каждом локусе был идентифицирован ген, предположительно являющийся «фактором азооспермии» — DFFRY (Drosophila Developmental gene Fast Facets) в AZFa, RBM (RNA-Binding Motif) в AZFb и DAZ (Deleted in Azoospermia) в AZFc [209, 230, 366, 417].

За исключением очень редких случаев наследования [291, 624, 891], делеции в участке Yq11 возникают *de novo* в результате мутаций в клетках сперматогенного ряда, а возможно, и позже, на ранних стадиях развития эмбриона [388]. Носители делеции в большинстве своем бесплодны и, следовательно, могут передать аномалию потомству только с помощью методов вспомогательной репродукции. При этом потомок мужского пола с неизбежностью получит Y-хромосому, несущую делецию, и будет иметь ту же или более тяжелую форму нарушения сперматогенеза [891].

Следует отметить, что локализация и частота микроделений в локусах AZF (a, b, c) варьируют, однако наиболее часто при азооспер-

мии наблюдаются делеции в AZFc. Следовательно, чувствительность и специфичность микроделеционного анализа района Yq11 определяется используемыми ДНК-маркерами. Несмотря на опыт, накопленный во многих странах мира, существуют разногласия о расположении и спектре STS-маркеров вдоль Y-хромосомы. Между тем, на основании неоднократно подтвержденной специфичности некоторых из них, разработано несколько тест-систем, эффективных для скрининга микроделений в локусе AZF у пациентов с бесплодием.

Изучение корреляции между степенью нарушения сперматогенеза и микроделениями важно для понимания роли AZF. Однако пока попытки установления специфичного проявления микроделеции при гистологическом и цитологическом анализе образцов яичка не увенчались успехом. Результаты исследований противоречивы, однако некоторые закономерности можно считать установленными. Так, делеции в AZFa обычно сопровождаются синдромом «только клетки Сертоли» типа I и в редких случаях — тяжелым гипосперматогенезом. Делеции в AZFc вызывают нарушения сперматогенеза различной степени тяжести. Делеции AZFb связывают с более тяжелыми аномалиями сперматогенеза, чем при делеции AZFc. Показано, что в яичках примерно у 2/3 пациентов с делециями AZFc могут быть обнаружены зрелые сперматозоиды, а при делеции AZFb они, как правило, отсутствуют.

В среднем, при необструктивной азооспермии частота микроделений составляет 15%, а при тяжелой олигозооспермии — 6% [443, 486, 488, 730, 781, 891]. Интересно отметить, что делеции в AZF выявлены и у пациентов с нормозооспермией [317, 624, 716].

Естественно, что локус AZF — не единственный детерминант сперматогенеза. Блок сперматогенеза и стерильность могут быть следствием мутаций в гене CFTR (локус 7q21.1), в гене половой дифференцировки SRY (локус Yp11.1), в гене андрогенового рецептора (AR) (район Xq11-q12) и других.

Так, известно, что мутации в гене CFTR, кодирующем трансмембранный регуляторный белок, ответственный за транспорт электролитов, вызывают симптомы муковисцидоза. Некоторые из известных более 900 мутаций в этом гене приводят к непроходимости семявыводящих протоков и сопровождаются нарушениями сперматогенеза разной степени тяжести, часто без манифестации других признаков муковисцидоза [322, 365, 476].

Прогрессирующая непроходимость, а также врожденное билатеральное отсутствие *vas deferens* (CBAVD) приводят к аспермии [421]. В целом, частота гетерозиготных носителей отдельных мутаций гена CFTR среди пациентов с CBAVD составляет 47%, а в компаунде с другими мутациями — 19% [339]. Однако с учетом одностороннего отсутствия *vas deferens* (CUAVD), при котором фертильность сохраняется, частота мутаций может быть выше. Более того, 14,3% мужчин с необструктивной азооспермией и 17,5% с олигоспермией оказались гетерозиготными носителями какой-либо из 13 тестируемых мутаций гена CFTR [317].

Предполагают, что не менее значительный вклад (> 40%) в идиопатическое мужское бесплодие вносят мутации в гене андрогенового рецептора (AR) [215]. Известно, что делеции и точковые мутации в гене AR приводят к тестикулярной феминизации (женщины с кариотипом 46,XY) или синдрому Райфенштейна [613], а увеличение числа тринуклеотидных повторов CAG_n в экзоне 1 — к болезни Кеннеди, которая относится к числу «болезней экспансии» [44]. Частота мутаций гена AR при нарушениях сперматогенеза пока не выяснена, однако роль точковых мутаций в гормонсвязывающем домене в развитии олигоастенотератозооспермии давно доказана [722].

Следует напомнить, что ген SRY является главным геном-регулятором развития по мужскому типу [204]. Мутации в этом гене сопровождаются широким диапазоном клинических и фенотипических проявлений — от полной реверсии пола [411, 441] до недоразвития мужских гонад [131]. Частота мутаций в гене SRY при реверсии пола (женщины с кариотипом 46,XY) составляет 15–20% [277], при других отклонениях половой дифференцировки и нарушениях сперматогенеза она точно не установлена. Однако, несмотря на заведомо низкую вероятность выявления мутаций, молекулярный анализ гена SRY представляется целесообразным при комплексном обследовании.

Разработанный нами алгоритм обследования мужского бесплодия, который включает кариотипирование, ККАНПК, а также микроделеционный анализ локусов AZF, доказал свою эффективность при поиске причин нарушения сперматогенеза и определения тактики преодоления бесплодия [113, 194].

Не вызывает сомнения, что сперматогенез как сложноорганизованная и строго упорядоченная цепь событий, регулируется множеством факто-

ров. Список генов, имеющих непосредственное отношение к формированию гонады и ее функциям, постоянно пополняется. Однако и в настоящее время многие из причин мужского бесплодия могут быть установлены при комплексном цитогенетическом и молекулярно-генетическом исследовании.

4.3. Методы исследования оогенеза

Цитогенетический анализ в процессе оогенеза возможен как в период формирования женских гонад, так и после рождения (табл. 4.2). У зародышей доступны анализу митотически делящиеся оогонии и ооциты I в профазе мейоза (стадии лептотены, зиготены, пахитены, диплотены). После рождения объектами исследования обычно являются ооциты, получаемые в рамках программы ЭКО. Иными словами, изучение ранних стадий мейоза ограничено материалом от медицинских или спонтанных абортусов, а мейотических метафазных хромосом человека — яйцеклетками, не оплодотворившимися в условиях *in vitro*.

4.3.1. Анализ хромосом в первом делении мейоза

4.3.1.1. Профаза I

Как уже отмечалось (см. главу 1), ооциты человека вступают в мейоз на ранних стадиях эмбрионального развития. Несмотря на труднодоступность материала, неоднократно предпринимались попытки изучить поведение хромосом в профазе I с помощью традиционных цитогенетических методов или путем анализа тотальных СК [246, 556, 586, 592, 686, 803, 821]. Молекулярно-цитогенетические и иммуноцитохимические методы предоставили новые возможности для анализа процессов конъюгации и рекомбинации в оогенезе, однако работы такого рода единичны [225, 296, 297].

К настоящему времени на материале медицинских абортусов 6–24 недель развития установлена хронология профазы I. Так, ооциты на стадии лептотены — зиготены появляются на 9-й неделе и сохраняются в яичниках плодов до 24-й недели беременности, первые ооциты на стадиях пахитены — диплотены зарегистрированы одновременно с диктиотеной в 13–14 недель [357]. Известно также, что у новорожденных все ооциты в яичнике находятся на стадии диктиотены. Аналогичные данные

Таблица 4.2. Материал, доступный для цитогенетического анализа оогенеза у человека

<p>1. Оогонии и ооциты в профазе первого деления мейоза</p> <ul style="list-style-type: none"> • эмбрионы 9–26-й недель развития
<p>2. При использовании методов ЭКО*:</p> <p>Незрелые ооциты</p> <ul style="list-style-type: none"> • стадия зародышевого пузырька (профаза первого деления мейоза, поздняя диплотена) • разрушение зародышевого пузырька (диакинез) • метафаза первого деления мейоза (М1) <p>Зрелые ооциты</p> <ul style="list-style-type: none"> • метафаза второго деления мейоза (МII) + первое полярное тельце (ППТ) • изолированное ППТ (биопсия, выполненная для генетической диагностики) <p>Ооциты, используемые для оплодотворения <i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • неоплодотворившиеся ооциты в МII • оплодотворившиеся ооциты <ul style="list-style-type: none"> • нормальные зиготы (с женским и мужским пронуклеусами) + второе полярное тельце (ВПТ) • изолированное ВПТ (биопсия, выполненная для генетической диагностики) • аномальное оплодотворение (полиплоидная зигота) • незавершенное оплодотворение: хромосомы в МII + преждевременно конденсированные хромосомы отцовского пронуклеуса, хроматиновые массы и т. д. • ооциты, активированные к партеногенетическому развитию <p>Дробящиеся эмбрионы</p> <ul style="list-style-type: none"> • нормальное развитие • аномальное развитие (остановка дробления, фрагментация) <p>Биопсия эмбриона</p> <ul style="list-style-type: none"> • изолированные бластомеры от эмбриона на стадии дробления • биопсия трофэктодермы на стадии бластоцисты

* См. [379].

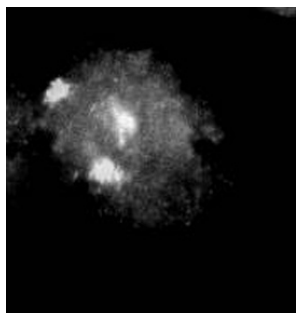
были получены и при исследовании спонтанных выкидышей 6–40 недель развития без видимых пороков органов и систем [94]. Таким образом, в яичниках эмбрионов и плодов с 6-й по 40-ю недели ооциты находятся на разных стадиях профазы мейоза, что обусловлено асинхронностью вступления в мейоз. При этом гетерогенность ооцитов закономерно изменяется по мере нормального внутриутробного развития.

Динамика изменения соотношения ооцитов на стадиях профазы I у плодов с различной, в том числе и хромосомной патологией, практически не изучена. С целью выяснения особенностей процесса мейоза в

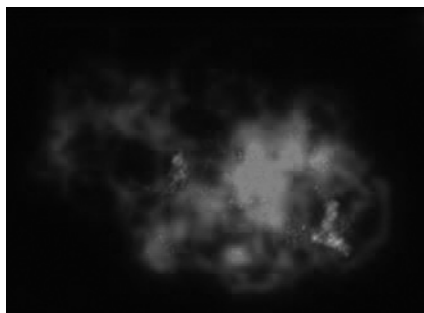
развивающихся яичниках у плодов с врожденными пороками развития и хромосомными болезнями нами были предприняты специальные исследования [86]. Хронология профазы I была изучена на хромосомных препаратах, полученных из аутопсийного материала яичников от 58 плодов женского пола сроком развития 19–26 недель беременности. В 12 случаях материал был получен от спонтанных абортусов, в 31 случае — после прерывания беременности по социальным показаниям и в 15 — в связи с наличием хромосомных болезней ($n = 7$) или врожденными пороками развития ($n = 8$). По результатам патоморфологического исследования, все индуцированные абортусы, полученные в результате прерывания беременности по социальным показаниям, соответствовали сроку беременности и не имели пороков развития. Поэтому мы сочли возможным использовать их в качестве условно нормальной, контрольной группы. Все плоды из группы спонтанных абортусов имели признаки внутриутробной задержки развития, сопровождавшиеся плацентарной недостаточностью. Врожденные пороки развития были представлены пороками нервной и сердечно-сосудистой систем, а хромосомные — трисомией 21 ($n = 4$) и трисомией 18 ($n = 1$).

Сравнительный анализ распределения ооцитов по стадиям профазы показал, что в случаях остановки или замедления темпов внутриутробного развития при отсутствии аномалий морфогенеза отмечается задержка мейоза на стадии лептотены. Формирование множественных пороков развития, включая нервную и сердечно-сосудистую системы сопровождается ускорением темпа мейоза, которое выражается в снижении численности ооцитов начальных стадий профазы и резком увеличении числа ооцитов на стадиях пахитены — диплотены. Влияние трисомии 21 и 18 на динамику профазы проявляется двояким образом. Часть ооцитов в ускоренном темпе преодолевает начальные стадии профазы, достигая стадии диплотены, тогда как остальные проходят стадии прелептотены — лептотены в замедленном темпе или претерпевают остановку на стадии зиготены. При этом в большинстве ооцитов у плодов с трисомией триада хромосом 21 представлена унивалентами, что, по-видимому, является одним из признаков их неспособности к завершению профазы мейоза.

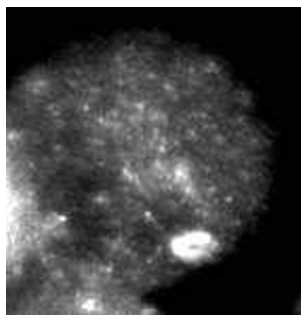
К сожалению, следует признать, что сведения об изменении хронологии начальных стадий оогенеза недостаточны для понимания механизмов действия тех или иных факторов на профазу первого мейотического деления. Однако полученные нами результаты иллюстрируют



а)



б)



в)

Рис. 4.7. Мейоциты из яичника от медицинского абортуса (кариотип 47,XX,+21) сроком развития 21/22 недели. FISH с целенохромосомным ДНК-зондом к хромосоме 21. Варианты конъюгации хромосом 21: а — полный асинапсис хромосом триады, б — бивалент + унивалент, в — тривалент

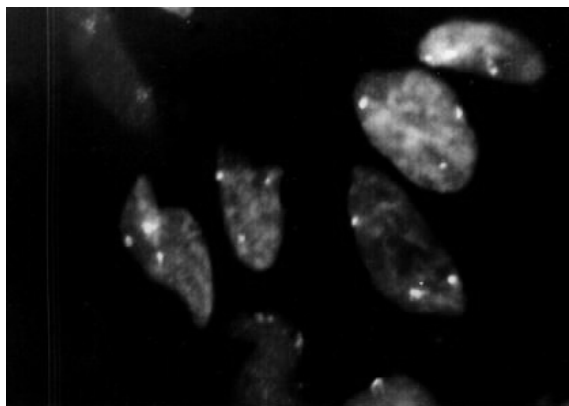


Рис. 4.8. Препарат из яичника медицинского абортуса с кариотипом 69,XXX сроком развития 18 недель. FISH с ДНК-зондом DXZ1, специфичным к прицентромерному району X-хромосомы (DXZ1)

многообразии причин, приводящих к изменению динамики мейотических преобразований в эмбриональный и плодный периоды развития человека.

Особый интерес представляют результаты анализа профазных хромосом у плодов с несбалансированным кариотипом (рис. 4.7). Так, при трисомии 21 и 18 наблюдается как полный асинапсис хромосом триады, так и конъюгация гомологов, которая осуществляется двояким образом — бивалент + унивалент или тривалент [225, 297]. СК в триваленте формируется либо по всей длине триады хромосом 21, либо частично, с образованием «шпилек» [882].

Как известно, в ходе эмбрионального развития наблюдается массовая гибель ооцитов (см. главу 1). Предполагается, что одной из причин такой гибели является аномальная конъюгация хромосом [640, 802]. Повышенная частота атретичных ооцитов у анеуплоидных плодов [225] и полное отсутствие мейоцитов у плода 69,XXX (рис. 4.8) [88] согласуются с этой гипотезой. Однако механизмы, регулирующие вступление ооцитов в апоптоз, до сих пор не выяснены [647]. Таким образом, профазы мейоза у эмбрионов женского пола с нормальным и гетероплоидным кариотипом является уникальной естественной моделью для изучения конъюгации хромосом, антенатальной селекции ооцитов и анализа контролируемых механизмов запрограммированной клеточной гибели — апоптоза.

4.3.1.2. Метафаза I

Начиная со стадии диакинеза, цитогенетические исследования возможны исключительно на яйцеклетках, полученных после гормональной стимуляции в рамках программ ЭКО. В отличие от естественного цикла, при котором овулирует, как правило, только один ооцит, после гормональной стимуляции путем аспирации больших фолликулов возможно получение 10–20 яйцеклеток различной степени зрелости [406]. Большая часть таких яйцеклеток находится на стадиях метафазы I или метафазы II. Незрелые яйцеклетки более ранних стадий в условиях программы ЭКО встречаются сравнительно редко [873]. Однако они могут быть получены путем аспирации фолликулов при различных операциях, связанных с резекцией яичника.

Дальнейшие преобразования профазного ядра (зародышевого пузырька) при созревании ооцитов человека изучены крайне слабо. Известно, что вплоть до полового созревания, ооцит находится на стадии диктиотены. На этой стадии ядро представляет собой крупный пузырек (так называе-

мый «зародышевый пузырек»), в котором визуализируются многочисленные хроматиновые блоки — хромоцентры. В начале периода созревания в нем формируется кариосфера — комплексная ядерная структура, состоящая из клубка хромосом, расположенных вокруг ядрышка. Установлено, что кариосфера образуется в периоде, предшествующем овуляции, когда ооцит уже утрачивает связь с клетками гранулезы [183].

Первым морфологическим признаком созревания является разрушение зародышевого пузырька, конденсация диплотенных хромосом и визуализация бивалентов.

Основные работы по изучению хромосом после разрушения зародышевого пузырька проведены исключительно на модельных объектах. Как показано в экспериментах на мышах и крысах, хромосомы к концу профазы имеют разную степень спирализации и гетерохроматизации [54]. Биологический смысл этого явления остается загадочным. Нередко в диакинезе — метафазе I у мыши регистрируют униваленты, которые могут указывать на предрасположенность к преждевременному расхождению хромосом в первом делении созревания. Гипогаплоидия, три-, тетра- или мультиваленты могут указывать на наличие транслокации [379].

Расхождение хромосом из бивалента происходит таким образом, что в результате 1-го мейотического деления одна из гомологичных хромосом остается в ооците, а вторая уходит в 1-е полярное тельце. После первого (редукционного) деления мейоза в ооците и в полярном тельце остается по 23 хромосомы (диады). При 2-м делении мейоза расходятся сестринские хроматиды каждой из оставшейся гомологичной хромосомы (диады). В результате второго (эквационного) деления, которое наступает только после оплодотворения, ооцит и 2-е полярное тельце получают по 23 сестринские хроматиды (рис. 1.3).

4.3.1.3. Первое полярное тельце

Поведение хромосом, попавших в первое полярное тельце (ППТ), также заслуживает внимания. У мышей этот хромосомный набор, как правило, не формирует ядра и доступен для цитогенетического анализа в течение нескольких часов. ППТ блокировано на стадии метафазы и дегенерирует во время или сразу после второго деления созревания [54]. Хронология преобразований ППТ у человека детально не описана. Как правило, ППТ дегенерирует вскоре после аспирации ооцита [715]. В некоторых случаях

дегенерация ППТ начинается через 48 часов от начала культивирования, что делает возможным его цитогенетический анализ в течение нескольких часов после оплодотворения *in vitro* [379]. Хромосомы ППТ состоят из двух хроматид и обычно имеют неясные контуры («пушистые»), что затрудняет их идентификацию при традиционных методах дифференциального окрашивания. Однако в ряде случаев они доступны для подсчета [379]. Последнее обстоятельство имеет принципиально важное значение для диагностики анеуплоидии, так как подавляющее число трисомий у человека обусловлено нерасхождением материнских хромосом в первом делении мейоза [514].

Следует отметить, что цитогенетическая диагностика с анализом ППТ у человека почти не используется. По-видимому, это связано с трудностями методического плана, а также с дегенерацией ППТ у большинства получаемых ооцитов. Применение метода мультиплексной FISH с использованием хромосом-специфических ДНК-зондов к хромосомам 13, 16, 18, 21 и 22 позволяет решить эту проблему для анализа наиболее частых типов трисомий (рис. 4.9). Вместе с тем, структурные aberrации, возникшие *de novo*, выявить не удастся [871].

Определенный оптимизм вселяют новые подходы, направленные на получение препаратов изолированных полярных телец, качество хромосом на которых позволяет успешно проводить цитогенетический анализ. Так, усовершенствование методики приготовления препаратов позволило достичь 94,1% эффективности анализа хромосомного набора ППТ у человека [311]. Методом спектрального кариотипирования (SKY) был проведен анализ ППТ, который показал перспективность использования этого метода для идентификации всех хромосом набора [596].

4.3.2. Анализ хромосом во втором делении мейоза

Ошибки сегрегации хромосом в женском мейозе можно оценить непосредственно в оплодотворенной яйцеклетке на



Рис. 4.9. Первое полярное тельце неоплодотворившегося ооцита. FISH с ДНК-зондом D18Z1, специфичным к прицентромерному району хромосомы 18

метафазе первого деления дробления. Объединение двух родительских наборов хромосом в одно клеточное ядро происходит после формирования метафазной пластинки из хромосом материнского и отцовского пронуклеусов. Различная степень спирализации хромосом отцовского и материнского пронуклеусов (то есть гетероцикличность родительских хромосом) позволяет не только установить ploидность оплодотворенной яйцеклетки, но и судить о происхождении гетероплоидии. К сожалению, подобные исследования были проведены только в эксперименте [378].

Прямых доказательств нерасхождения материнских хромосом во втором делении мейоза, основанных на анализе хромосом первого деления дробления зиготы у человека, не получено. Вместе с тем, при определении родительского происхождения анеуплоидии у плодов человека и новорожденных с использованием цитогенетических и ДНК-маркеров установлено, что около 20% случаев анеуплоидии обусловлено нерасхождением хромосом именно во втором делении созревания ооцита [449].

4.3.2.1. Метафаза II

Большинство данных, касающихся анализа хромосом в оогенезе у человека, получено на препаратах ооцитов, не оплодотворившихся в культуре *in vitro* и заблокированных на стадии МII [535]. Анализ литературных данных позволяет сделать вывод о высокой частоте хромосомных aberrаций в МII ооцитах человека, которая варьирует от 4% [386] до 58% [897]. Значительная вариабельность полученных результатов может быть связана как с методами приготовления хромосомных препаратов, существенно влияющих на качество метафазных пластинок, так и с трудностями идентификации и подсчета конденсированных хромосом (рис. 4.10, 4.11). Нельзя не отметить и отсутствие унифицированного подхода к отбору ооцитов и метафазных пластинок для анализа. Методы, применяемые для кариотипирования ооцитов на стадии МII, в принципе те же, что используются и для цитогенетического анализа дробящихся яйцеклеток и, по сути, представляют собой различные модификации классического варианта метода А. Тарковского [827].

4.3.2.2. Второе полярное тельце

Образование второго полярного тельца (ВПТ) стимулируется оплодотворением или агентами, активирующими партеногенетическое развитие. Хромосомы ВПТ претерпевают изменения, характерные для

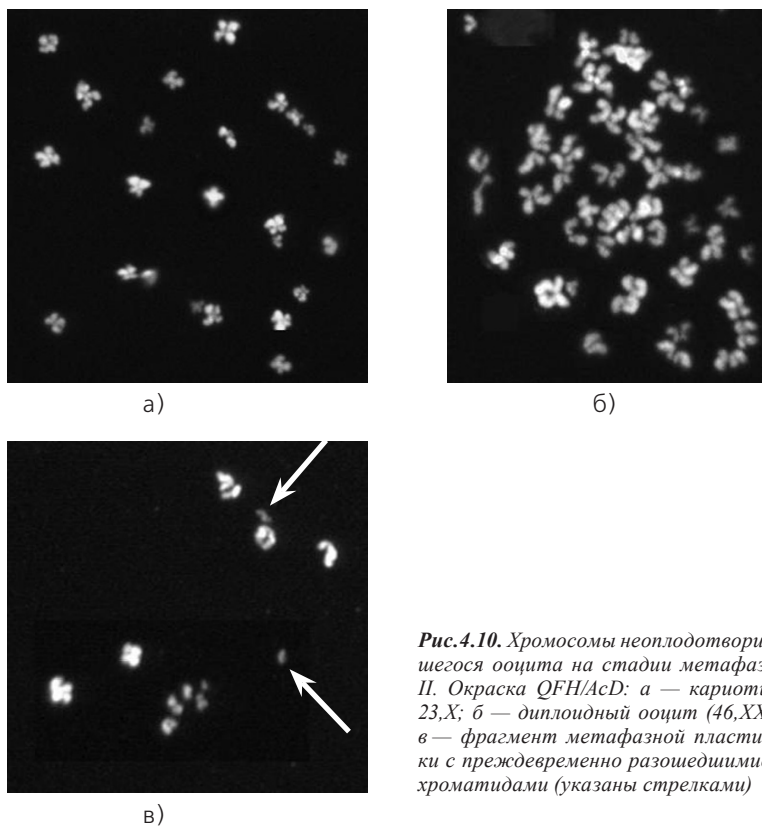
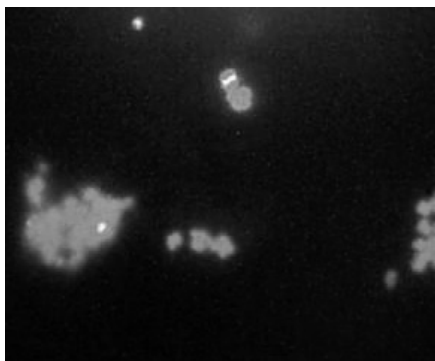


Рис.4.10. Хромосомы неоплодотворившегося ооцита на стадии метафазы II. Окраска QFН/AsD: а — кариотип 23,X; б — диплоидный ооцит (46,XX); в — фрагмент метафазной пластинки с преждевременно разошедшимися хроматидами (указаны стрелками)

Рис.4.11. Ооцит на стадии метафазы II (фрагмент метафазной пластинки) и первое полярное тельце (слева). FISH с ДНК-зондом DXZ1, специфичным к прицентромерному району X-хромосомы



стадий анафазы и телофазы, и остаются заблокированными на стадии интерфазы. Поскольку ВПТ никогда не вступает в митоз, для анализа его хромосом используют молекулярные методы (FISH и ПЦР). С помощью этих методов показано, что частота анеуплоидных ВПТ составляет около 25% [725]. К настоящему времени опубликовано большое число работ с использованием этих методов для доимплантационной диагностики хромосомных и, в основном, моногенных болезней [756].

Более полное представление о частоте и спектре хромосомных aberrаций, возникающих при втором делении мейоза, а также о влиянии различных факторов на хромосомный аппарат в этот период созревания ооцита, может дать прямой хромосомный анализ ВПТ. Реальность такого подхода была продемонстрирована в оригинальных экспериментах на мышах при трансплантации ВПТ в цитоплазму зиготы [641]. В дальнейшем этот метод был с успехом применен для анализа хромосом ВПТ и у человека [874]. Высококачественные хромосомные препараты получают путем слияния ВПТ с нормальной или энуклеированной зиготой мыши под действием электрического импульса. Полученные таким способом хромосомы идентифицируют с помощью стандартной дифференциальной окраски [415]. В дальнейших исследованиях эти авторы успешно совместили инъекцию ВПТ человека в цитоплазму ооцита мыши и электрошок. Метод оказался эффективным для получения метафазных хромосом изолированного ВПТ. Он нашел практическое применение для прижизненного анализа материнского набора хромосом в дробящемся зародыше человека как с помощью традиционных, так и молекулярно-цитогенетических методов хромосомного анализа [872]. Подробно с техникой приготовления хромосомных препаратов из первого и второго полярных телец можно ознакомиться в прекрасно иллюстрированной монографии Ю. Верлинско-го и А. Кулиева [871].

Визуализация хромосом во втором делении мейоза может быть достигнута с помощью оадаевой кислоты, которая индуцирует преждевременную конденсацию интерфазных хромосом — Premature Condensation Of Chromosome (PCC) обоих пронуклеусов в оплодотворенной яйцеклетке и ВПТ [57, 377, 378]. Именно этот подход позволил установить ряд важных сведений о поведении мейотических хромосом

в оогенезе мышей-носительниц транслокации. В частности, были получены прямые доказательства существования механизма «предделения» и обнаружена предрасположенность отдельных хромосом к преждевременному разделению сестринских хроматид. Попытки применения оокадаевой кислоты для проведения аналогичных исследований у человека оказались неудачными [378].

4.3.3. Перспективные методы анализа мейотических хромосом

Сравнительно недавно разработаны методы, позволяющие проводить прямой анализ сегрегации хромосом в мейозе. Созревающие или блокированные на стадии МII ооциты обрабатывают антителами к тубулину (белку митотического веретена). Иммуофлуоресценция анти-тубулина при сочетании с окрашиванием хромосом позволяет проследить их поведение [206, 393], а также проводить прижизненные наблюдения за преобразованиями веретена [626]. С помощью этих методов возможен анализ ориентации хромосом на стадиях прометафазы и метафазы первого деления мейоза и регистрация отставания гомолога или ошибок расхождения гомологичных хромосом (рис. 4.12)*. У млекопитающих, ооциты которых способны к развитию со стадии диктиотены до метафазы II в условиях *in vitro*, принципиально возможен анализ клеточного цикла, а также специфических для каждой стадии изменений экспрессии генов [371].

Аналогичных методов для исследования сперматогенеза до сих пор не предложено. В качестве перспективных можно назвать иммуофлуоресцентный метод для анализа процессов конъюгации и рекомбинации (рис. 4.13)*, а также методы культивирования сперматоцитов на подложке из сертолиподобных клеток [580] и в яйцеклетке [216]. Последние два подхода могут дать принципиально новые сведения об особенностях клеточных циклов элементов сперматогенного ряда и другие данные, важные для понимания многих аспектов созревания мужских гамет.

Таким образом, исследования гаметогенеза позволяют проводить прямой анализ хромосом как в женском, так и в мужском мейозе. Разработаны и применяются на практике методы прижизненного анализа

* Рисунок на цв. вкл.

хромосомного набора зрелых гамет. Однако большинство подходов основано на фиксации исследуемого материала, поэтому исчерпывающая информация о частоте и спектре хромосомных aberrаций, а также о механизмах их возникновения, дает лишь ориентировочное представление о судьбе зиготы с хромосомными нарушениями.

4.4. Методы исследования хромосом в раннем эмбриогенезе

Сведения о хромосомном анализе эмбрионов человека в первых делениях дробления крайне ограничены. У человека, как и у других млекопитающих, в метафазе первого деления дробления родительские наборы хромосом обнаруживают гетероцикличность. При этом хромосомы мужского пронуклеуса менее спирализованы и, соответственно, удлинены, тогда как женского — заметно укорочены [57]. Это позволяет достаточно точно определить родительскую принадлежность хромосомных аномалий. Начиная с 2-клеточной стадии, анализ мейотического нерасхождения родительских хромосом едва ли возможен. Во-первых, различия в конденсации родительских хромосом нивелируются уже при втором делении дробления, что не позволяет установить происхождение анеуплоидии. Во-вторых, нерасхождение или утрата хромосом могут быть обусловлены их аномальной сегрегацией при митотическом делении. По понятным причинам частота и типы хромосомных aberrаций на этих стадиях эмбриогенеза человека практически не изучены. Исключение составляют только ошибки оплодотворения, связанные с возникновением триплоидных или гаплоидных зародышей (см. ниже).

Рассматривая цитогенетические аспекты раннего эмбриогенеза человека важно учитывать следующие обстоятельства. Классический цитогенетический подход основан на анализе достаточного количества метафазных пластинок. Работы по стандартному кариотипированию ранних зародышей человека немногочисленны и выполнены, в основном, на зародышах, имевших три пронуклеуса, то есть являющихся триплоидными и, соответственно, не пригодными для трансплантации [856]. При этом, как отмечают некоторые авторы [409, 703], не более 8 % метафазных пластинок нормально дробящихся зародышей удовлетворяют требованиям цитогенетического анализа. В связи с низким качеством или отсутствием метафазных пластинок практически невозможен и традиционный анализ

зародышей, остановившихся в развитии на стадии нескольких клеток или подвергшихся фрагментации. Поэтому подавляющее большинство исследований проведено с использованием мультиплексной FISH на интерфазных ядрах бластомеров 8–10-клеточных эмбрионов [331] (рис. 4.14)*. Однако мультиплексная FISH основана на маркировании некоторых локусов отдельных хромосом и поэтому не дает полной информации о числе и структуре всех хромосом набора. Другие молекулярно-цитогенетические методы (PRINS, CGH, SKY), а также различные варианты ПЦР, недостаточно информативны для корректной оценки кариотипа эмбриона по единичным бластомерам [654].

4.5. Методы исследования хромосом в постимплантационном периоде

Помимо аутопсийного материала от медицинских и спонтанных абортусов, доступными для изучения хромосомных аномалий у эмбрионов человека постимплантационных стадий, являются образцы тканей, полученные при помощи инвазивных методов (см. главу 9). Последние практически безопасны для матери и плода и широко применяются в I и II триместрах беременности с целью пренатальной (дородовой) диагностики наследственных и врожденных болезней. Объектами цитогенетических исследований являются образцы плодных оболочек (хориона и плаценты), клетки амниотической жидкости и лимфоциты пуповинной крови плода. Все эти ткани и клетки имеют разное эмбриональное происхождение (см. главу 1).

Уместно напомнить, что хорион, возникающий из трофобласта, внезародышевой эктодермы и внезародышевой мезодермы, является внешней оболочкой зародыша (рис. 1.6). Обособление от внутренней клеточной массы (ВКМ) и дифференцировка трофобласта происходят на стадии ~ 32 клеток. К моменту имплантации (5–7-й день) трофобласт состоит из двух типов клеток — цитотрофобласта, окружающего зародыш и образующего первичные ворсины в области имплантационного поля, и синцитиотрофобласта, который формирует их наружный слой и представляет собой симпласт. На 13–14-й день формируются вторичные ворсины, при этом цитотрофобластические выросты заполняются мезенхимой, происходящей из внезародышевой мезодермы.

* Рисунок на цв. вкл.

Третичные ворсины, образующиеся к 5–7-й неделе, характеризуются наличием кровеносных сосудов. По мере развития ворсины хориона приобретают ветвящуюся структуру (рис. 1.14).

Таким образом, сформированный ворсинчатый хорион представляет собой активно растущую и дифференцирующуюся ткань, образованную клетками различного происхождения (рис. 1.6). Митотической активностью обладают клетки цитотрофобласта (клетки Лангханса), которые концентрируются на вершинах и у основания ворсин в местах их ветвления. Возникновение новых разветвлений (рамыфикация) происходит с различной интенсивностью на протяжении всей жизни плаценты. Процесс старения хориона сопровождается исчезновением клеток цитотрофобласта, которые служат источником образования синцития [186].

Амнион является внутренней оболочкой зародыша и является производным первичной эктодермы. Дифференцировка амниона происходит на 7,5–8-й день развития (см. главу 1, рис. 1.8, 1.16). Амниотическая полость быстро увеличивается и после сращения серозной (амниотической) оболочки с хорионом формирует единую оболочку (амниохорион). Околоплодные воды, которыми заполняется амниотическая полость, выполняют роль буфера, предохраняющего эмбрион, а затем и плод, от внешних воздействий. В амниотической жидкости (АЖ) содержатся эпителиальные клетки внутренней стенки амниона (так называемые амниоциты), дыхательных, пищеварительных, мочеполовых путей и эпидермиса плода [694]. Качественный и количественный состав клеток АЖ имеет индивидуальную вариабельность. Большая часть их нежизнеспособна, особенно после 20-й недели беременности. Концентрация жизнеспособных клеток АЖ максимальна на 16–20-й неделе беременности [67].

Таким образом, хорион, дающий начало плаценте, и амнион образуются от ВКМ на ранних этапах эмбриогенеза. Цитотрофобласт хориона, будучи производным трофэктодермы, имеет внезародышевое происхождение, тогда как амнион, формирующийся из первичной эктодермы, является производным зародышевой структуры. Эмбриональное происхождение имеют и все другие типы эпителиальных клеток, взвешенных в АЖ. Эти особенности происхождения провизорных органов эмбриона имеют принципиально важное значение для интерпретации результатов, полученных при исследовании образцов плодных оболочек с целью пренатальной диагностики хромосомных болезней.

4.5.1. Клетки хориона (плаценты)

Первые попытки получения образцов хориона в первом триместре беременности с применением эндоскопической техники были предприняты в 1960–1970-е годы и проведены перед медицинским абортom [554, 642]. Первые массовые исследования хориона в целях диагностики пола плода по половому хроматину были осуществлены в Китае [423]. Однако значительное число послеоперационных осложнений и проблемы с получением хромосомных препаратов свидетельствовали против применения хорионбиопсии в диагностических целях [428, 454]. Повторный интерес к хорионбиопсии был связан с совершенствованием инструментальных методов и ультразвуковых приборов, а также с появлением новых подходов в пренатальной диагностике наследственных болезней [164, 540].

Трансцервикальная хорионбиопсия с помощью щипцов не нашла широкого применения и, насколько нам известно, у нас в стране выполняется только в одном центре [25]. Распространенным в середине 1980-х годов был метод трансцервикальной аспирации ворсин хориона при помощи гибкого катетера [427]. Последней модификацией биопсии хориона явилась трансабдоминальная аспирационная биопсия [269]. Неоспоримые преимущества этого метода (минимальный перечень противопоказаний для манипуляции и низкая частота послеоперационных осложнений, высокая эффективность получения материала и возможность использования в любой срок беременности) определили его ведущее место в пренатальной диагностике.

Независимо от способа получения образец хориона должен быть тщательно проанализирован при помощи лупы или инвертированного микроскопа с целью отбора типичной для хориона или плаценты ткани и оценки количества биоптата. Морфологический контроль имеет особенно большое значение, если для дальнейшего анализа предполагается использование молекулярно-генетических методов или культивирования. Строгие критерии отбора ворсин значительно сокращают вероятность контаминации и не столь существенны для приготовления препаратов спонтанных митозов.

Для хромосомного анализа по клеткам хориона или плаценты используют два основных подхода — длительное культивирование в монослойной культуре и так называемый «прямой», исключающий поддержание клеток в условиях *in vitro*.

4.5.1.1. Культивирование клеток хориона

Способность клеток ворсинчатого хориона к пролиферации в условиях культуры сделала их привлекательными для пренатальной диагностики хромосомных болезней. Однако вопрос происхождения клеток, образующих клоны, долгое время оставался открытым. В настоящее время установлено, что клетки, делящиеся *in vitro* в условиях перевиваемых культур, представляют собой фибробласты мезенхимной стромы ворсины [667].

Существует большое число модификаций культивирования клеток ворсин хориона (КВХ). Подробнее ознакомиться с ними можно в соответствующей литературе [67, 391, 765, 875]. Отметим лишь, что растущие первичные культуры имеют гетерогенный клеточный состав с преимущественным ростом фибробластоподобных клеток. Образование колоний или рыхлого монослоя происходит обычно только к 10–12-му дню культивирования. Основные принципы анализа культур КВХ и интерпретации результатов аналогичны для культур КАЖ [749].

4.5.1.2. «Прямые» препараты

Метод анализа «прямых» препаратов базируется на исследовании спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта без их предварительного культивирования. Впервые препараты из ворсинчатой ткани хориона, содержащие метафазные пластинки удовлетворительного качества, без использования культуры клеток были получены группой миланских исследователей [391]. В последующие годы были предложены различные модификации метода, которые затрагивают все этапы обработки ворсин. По существу все варианты метода можно подразделить на два.

1. Собственно «прямой», основанный на кратковременной (2–3 часа) преинкубации нативных ворсин перед гипотонической обработкой и фиксацией [790, 835, 867].

2. «Полупрямой», предполагающий увеличение времени инкубации нативных ворсин в культуральной среде с питательными добавками до 24, 48 или 72 часов [726, 790].

Несмотря на кажущуюся простоту, этими способами многим исследователям не удается достичь стабильных результатов и потому они,

как правило, используются в сочетании с долгосрочным культивированием [391, 790]. Типичными недостатками прямого метода являются малое число метафазных пластинок, артефактная утрата хромосом при мацерации ткани в уксусной кислоте и малая пригодность хромосом для стандартной дифференциальной окраски красителем Гимза. Подсчет числа митозов на прямых и «полупрямых» препаратах показал, что при инкубации ворсин в течение 2–3 суток митотическая активность клеток цитотрофобласта выше, чем при 2- или 24-часовой инкубации [790]. Предполагается, что в момент биопсии клетки испытывают «шок», при котором нарушаются параметры клеточного цикла, и клетки не вступают в митоз [542].

В нашей лаборатории разработаны собственные модификации прямого метода — метод «стряхивания — отпечатывания» [9] и ускоренный прямой метод [184, 195]. Ускоренный прямой метод предполагает применение больших доз колхицина с одновременной обработкой в гипотоническом растворе. Ранее было показано, что проникновение колхицина через хорион-аллantoидную плаценту затруднено вследствие защитных функций синцитиотрофобласта [56]. Возможно, увеличение дозы колхицина и применение гипотонической обработки сразу после получения образца способствуют преодолению плацентарного барьера и препятствуют развитию клеточного шока. Существенным является и размягчение образца непосредственно на препарате, что минимизирует потери материала. Применение мягкой фиксации и последующая гидратация фиксированного материала благоприятно сказываются на морфологии хромосом и позволяют применять любые методы дифференциальной окраски, включая метод FISH (рис. 4.15). Следует подчеркнуть, что эта модификация пригодна для приготовления препаратов хромосом из тканей с высокой естественной митотической активностью, включая любые эмбриональные ткани и органы. Интерфазные ядра, обработанные таким способом, вполне пригодны для FISH-анализа со специфическими ДНК-зондами, что важно при верификации цитогенетического пренатального диагноза. Детально методики приготовления препаратов и вариантов дифференциальной окраски описаны нами ранее [16, 192].

При оценке результативности цитогенетического анализа следует руководствоваться критериями МЗ РФ [92] и требованиями, приняты-

ми в международной цитогенетической практике [408, 547]. Согласно этим документам заключение о кариотипе основывается на анализе не менее 11–15 метафазных пластинок. На 2–3 пластинках проводится идентификация всех хромосом набора, а остальные используются для подсчета хромосом.

Использование в нашей работе ускоренного прямого метода на более чем 8000 образцах хориона и плаценты позволило провести диагностику хромосомных болезней в 99,8 и 99,6 % случаев соответственно (см. главу 9, табл. 9.7). Применение полуавтоматических систем для анализа изображений существенно повысило скорость, надежность и эффективность анализа. Необходимо признать, однако, что число митозов на прямых препаратах из хориона и, особенно, из плаценты существенно ниже, чем на препаратах из культур клеток.

4.5.1.3. Митотическая активность клеток цитотрофобласта

Невысокий митотический индекс цитотрофобласта может быть связан с особенностями клеточного цикла этих клеток. При изучении хориона человека 6–16 недель беременности с H^3 -тимидином было обнаружено, что временные параметры клеточного цикла цитотрофобласта общей продолжительностью 15 часов обнаруживают сходство с хорионкарциномой [33]. Так, митотический цикл клеток Лангханса на ранних этапах развития характеризуется длительной постмитотической фазой G1 (7 часов). Синтез ДНК составляет 5,5 часа, после которого следует короткая предмитотическая фаза G2 (2 часа) и очень короткий по времени митоз. Согласно другим данным, полученным в исследованиях с помощью БДУ [903], продолжительность цикла клеток цитотрофобласта составляет 36 часов: фаза G2 занимает не более 4 часов, S-фаза — 10–16 часов, период G1 варьирует в широких пределах, а митотическая фаза оценивается как непродолжительная. Таким образом, данные относительно продолжительности клеточного цикла клеток цитотрофобласта и отдельных его фаз крайне противоречивы. Между тем, временные параметры митотического цикла клеток мезенхимной стромы в условиях *in vitro* по продолжительности отдельных фаз и цикла в целом соответствуют клеточному циклу фибробластов и амниотического эпителия [290, 543].

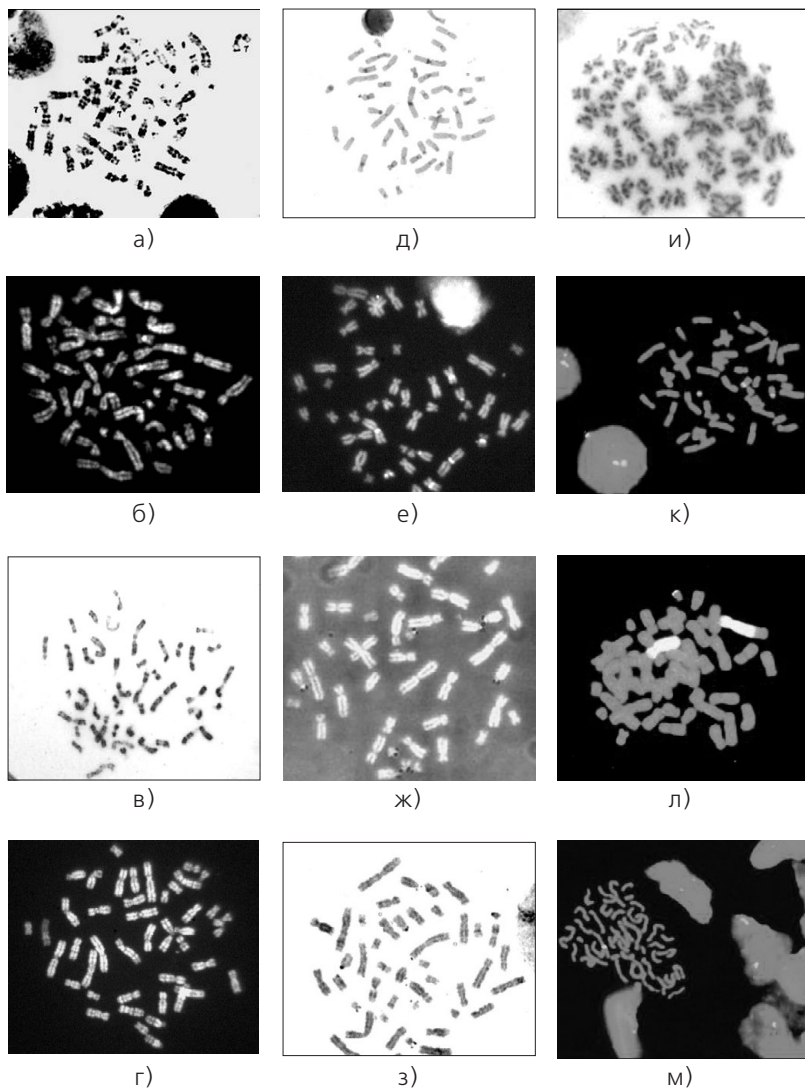


Рис. 4.15. Методические подходы к анализу хромосом клеток цитотрофобласта на «прямых» препаратах из ворсинчатого хориона или плаценты: а — GTG (47,XX,+7); б — QFH/AcD (47,XX,+21); в — FPG (47,XXX); г — RBA (46,XX); д — CBG (46,XY); е — QFH/MG (46,XY,9ph); ж — Ag-NOR+QFH/AcD; з — Ag-NOR+G; и — CXO (эндомиотоз); к — FISH с ДНК-зондом D18Z1 (47,XX,+i(18p)); л — FISH с цельнохромосомным ДНК-зондом к хромосоме 4 (46,XY,t(4;15)); м — FISH с ДНК-зондом DXZ1 (45,X)

Предпринимались неоднократные попытки выявить корреляцию между морфологическими особенностями ворсин хориона и величиной митотического индекса клеток цитотрофобласта. В частности, сообщалось о прямой корреляции между степенью васкуляризации ворсин и митотической активностью [24]. Вместе с тем, большинство исследователей сходятся во мнении, что степень васкуляризации, наличие терминальных ворсин и другие особенности строения хориона, не коррелируют с величиной митотического индекса на «прямых» препаратах из ворсин хориона [509, 737].

Предполагается, что процессы пролиферации и дифференциации цитотрофобласта могут зависеть от концентрации кислорода [111]. По крайней мере, культивирование ворсин хориона *in vitro* в атмосфере с высоким (5%) содержанием CO_2 и низким (2%) кислорода сопровождается увеличением митотической активности, тогда как 20%-ное содержание кислорода приводит к остановке клеточных делений [754]. Подъем митотической активности в условиях гипоксии, возможно, обусловлен активизацией экспрессии в клетках цитотрофобласта циклина В, регулирующего вступление клеток в митоз [754]. Любопытно, что митотическая активность клеток Лангханса зависит от времени суток — в вечерне-ночное время их митотическая активность в 2–3 раза выше по сравнению с утренне-дневным [33].

Известно, что пролиферация клеток цитотрофобласта варьирует в зависимости от срока беременности, что, очевидно, связано с особенностями функций хориона и плаценты. С начала второго триместра до конца беременности митотическая активность клеток цитотрофобласта постепенно снижается [832], что сопровождается постепенным истощением цитотрофобластического слоя [275]. Однако число митозов на «прямых» цитогенетических препаратах во II и даже в III триместрах беременности по мнению ряда авторов может оказаться вполне достаточным для кариотипирования плода [328, 565].

Уместно напомнить, что «прямые» препараты в зарубежных центрах пренатальной диагностики используются лишь в первом триместре беременности. Внедрение плацентобиопсии в клиническую практику потребовало определения верхних границ срока беременности, когда пренатальная диагностика с использованием «прямых» препаратов из плаценты нецелесообразна. Для выбора диагностических сроков, оп-

тимальных для кариотипирования плода во II триместре беременности, мы предприняли специальное исследование митотической активности клеток цитотрофобласта на прямых диагностических препаратах от 134 плодов разных сроков развития [99].

Подсчет митотического индекса (МИ) проводили по общепринятой формуле $МИ = N_m/N$, где N_m — число митозов, а N — общее количество клеток в исследуемой совокупности. Данная величина характеризует удельное значение фракций клеток, находящихся в митозе [108]. Из каждого образца анализировали по 1–3 препарата, полученные результаты суммировали.

Следует отметить, что несмотря на заметные индивидуальные различия, МИ в I триместре (максимум в срок 11–12 недель беременности) в среднем в 2 раза превышает таковой во II триместре и на порядок — в III триместре беременности (рис. 4.16) ($F = 48,09$; $P < 0,01$). Эти результаты подтвердили эмпирические наблюдения о том, что результативность пренатальной диагностики хромосомных болезней с использованием «прямых» препаратов на ранних сроках беременности выше, чем во втором триместре.

Как известно, в конце I триместра беременности завершается формирование плаценты, и она начинает выполнять все присущие ей многообразные функции (см. главу 1). В этот период происходит активная дифференцировка клеток цитотрофобласта и их слияние с образованием характерного синцития (синцитиотрофобласт) (рис. 1.14). Отмечается активный синтез белков, специфичных для хориального эпителия, в частности, хорионического гонадотропина (ХГЧ) и трофобластического β -гонадотропина (ТБГ) [353].

В литературе имеются многочисленные сведения о взаимосвязи между секрецией ХГЧ, дифференцировкой и пролиферацией трофобласта. Исследованию особенностей синтеза ХГЧ и его субъединиц клетками хориона посвящена обширная литература [338, 438, 886]. Известно, что ХГЧ играет решающую роль в процессах пролиферации цитотрофобласта и его дифференцировки в синцитиотрофобласт. В свою очередь, для нормальной продукции ХГЧ необходим пул клеток цитотрофобласта. Активной пролиферации цитотрофобласта в первом триместре соответствует значительное увеличение уровня β -ХГЧ в сыворотке крови матери [731]. Наши данные о наличии тенден-

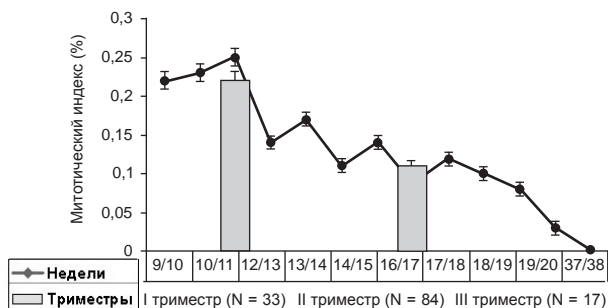


Рис. 4.16. Динамика митотической активности клеток цитотрофобласта хориона и плаценты у плодов человека на разных стадиях внутриутробного развития

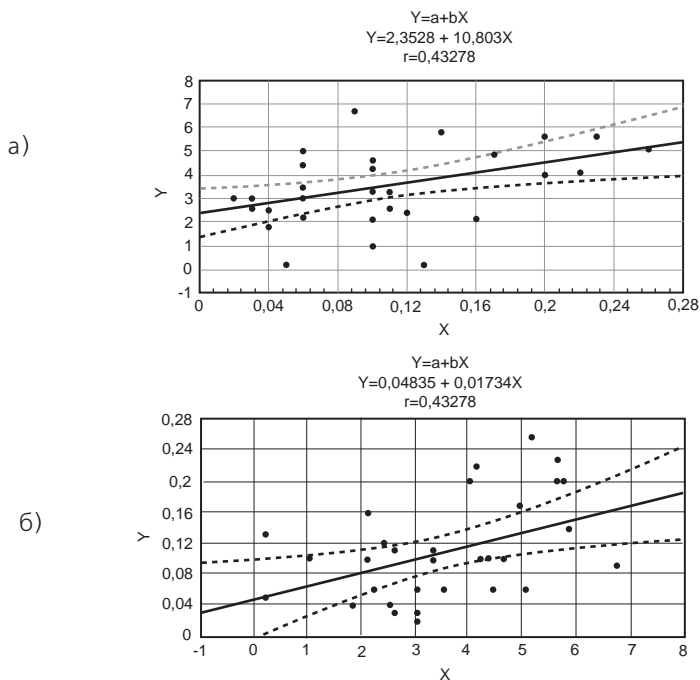


Рис. 4.17. Взаимосвязь митотической активности цитотрофобласта плаценты и уровня ХГЧ в сыворотке крови матери (графики линейной регрессии): а — по оси абсцисс — значения митотического индекса (МИ, %), по оси ординат — уровень ХГЧ (МоМ); б — по оси абсцисс — уровень ХГЧ (МоМ), по оси ординат — значения МИ (%).

ции к увеличению митотического индекса клеток цитотрофобласта при высоких показателях уровня ХГЧ в сыворотке крови матери во втором триместре беременности (рис. 4.17) подтверждают такую корреляцию.

Таким образом, цитотрофобласт является камбиальным слоем синцитиотрофобласта и совместно с ним обеспечивает гормональную функцию плаценты. Клетки цитотрофобласта претерпевают интенсивные митотические деления в первом триместре беременности; пик их митотической активности совпадает с высоким уровнем синтеза и секреции ХГЧ. Обнаруженная зависимость между повышенным уровнем ХГЧ и увеличением митотического индекса цитотрофобласта свидетельствует в пользу сопряженности этих процессов. МИ в цитотрофобласте косвенно отражает функциональное состояние плаценты. Поэтому при выборе тактики цитогенетической пренатальной диагностики во II триместре беременности следует учитывать уровень ХГЧ в сыворотке крови матери. С другой стороны, высокий МИ в клетках цитотрофобласта в поздние сроки беременности можно рассматривать как предвестник плацентарной недостаточности и гипоксии плода, что позволяет своевременно рекомендовать проведение профилактики этих наиболее частых акушерских осложнений (см. главу 9).

4.5.2. Клетки амниотической жидкости

В середине 1960-х годов было установлено, что часть клеток амниотической жидкости (КАЖ) способна к пролиферации и образованию колоний *in vitro* [814]. Несколько позднее АЖ, а также КАЖ стали использовать для биохимической диагностики некоторых заболеваний обмена веществ [659], а также для биохимической и молекулярной диагностики моногенных заболеваний [14].

Амниоцентез в целях пренатального кариотипирования обычно выполняют в период с 15-й по 17-ю неделю беременности. При амниоцентезе извлекается 20–50 мл АЖ, что составляет около 10–15% ее общего объема [736]. Количество жизнеспособных КАЖ в таком объеме вполне достаточно для успешного культивирования. Незначительное число послеоперационных осложнений способствовало широкому внедрению амниоцентеза в практику. В настоящее время в зарубежных странах трансабдоминальный амниоцентез является ведущим среди других инвазивных методов получения образцов плодного материала.

С повышением разрешающей способности ультразвуковых аппаратов появились возможности получения АЖ в 9–14 недель беременности. Учитывая небольшой общий объем АЖ и малое число жизнеспособных КАЖ, ранний амниоцентез для кариотипирования плода используется редко [25]. С целью увеличения КАЖ предложен метод амниофильтрации, при котором из образца АЖ в I триместре беременности извлекают только клетки, а саму АЖ возвращают в амниотическую полость [426]. Однако невысокая эффективность цитогенетической диагностики ранних амниоцитов (70–95 %) при высоком риске отдаленных негативных последствий раннего амниоцентеза, в частности, маловодия, заставляют с осторожностью относиться к его внедрению в клиническую практику [477].

Как уже отмечалось, состав КАЖ очень полиморфный. Точная идентификация типов клеток, дающих клональный рост, весьма затруднена (рис. 4.18). Оптимальным для цитогенетических исследований является амниотический эпителий — активно пролиферирующий клон клеток, специфический для данной культуры [67].

Несмотря на широкое использование культур КАЖ, не существует единой методики для получения из них хромосомных препаратов. Стандартное культивирование КАЖ включает следующие этапы: постановку культуры, субкультивирование, гипотоническую обработку и фиксацию. Для анализа культивированных КАЖ используют два основных подхода [749]:

Flask-method — культивирование клеток во флаконах и фиксация суспензии монослойной культуры после трипсинизации. Анализ проводят в двух из трех культур (по 10 метафаз для каждого образца). Если во всех метафазах наблюдается одинаковый кариотип, диагноз считается установленным. В случае обнаружения единичной метафазы с aberrантным кариотипом (числовым или структурным), анализируется резервная третья культура. Если одна и та же хромосомная aberrация определяется в более чем одной метафазе из одного флакона, но не подтверждается в остальных флаконах, устанавливается диагноз «псевдомозаицизм». В случае обнаружения одной и той же хромосомной аномалии в более чем одном флаконе, устанавливается диагноз «истинный мозаицизм».

Method in situ — культивирование и фиксация клеток на покров-

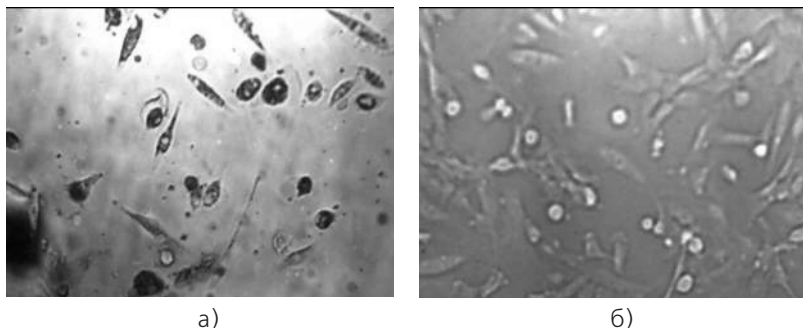


Рис. 4.18. Первичные культуры клеток амниотической жидкости (фазовый контраст): а — единичные прикрепившиеся клетки (первые сутки культивирования); б — колония клеток (пятые сутки культивирования)

ных стеклах в чашках Петри или в специальных флаконах-слайдах (рис. 4.19). Анализ проводят на метафазных пластинках из трех культуральных чашек или флаконов (всего анализируют 10 колоний). При выявлении аномального клона анализируют все культуры. Хромосомная aberrация, найденная лишь в одном культуральном флаконе/чашке, свидетельствует о «псевдомозаицизме», в более чем одном — об истинном мозаицизме.

Эти методы требуют культивирования с несколькими пассажами и занимают в среднем 2–3 недели. К недостаткам можно отнести высокую стоимость культуральных питательных сред и оборудования, что немало важно для отечественных лабораторий, а также высокую (до 2%) вероятность ошибочного заключения о кариотипе плода вследствие контаминации образца клетками материнского происхождения [290].

В последние годы разработан принципиально новый подход к анализу хромосом из культивированных клеток. Метод «pipett» основан на микроманипуляционной изоляции метафазных и про-

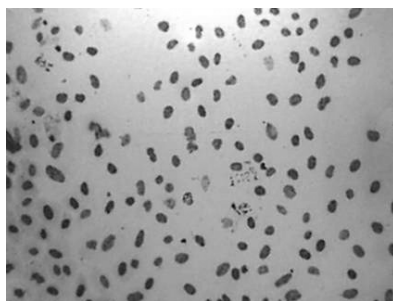


Рис. 4.19. Фрагмент колонии амниоцитов с метафазными пластинками (метод фиксации *in situ*). Окраска по Гимза (10×)

метафазных клеток из несуспензионных культур благодаря их морфологическим особенностям и ослаблению связи с субстратом [34, 313, 739]. Дальнейшая гипотоническая обработка и фиксация проводятся с единичными клетками. Этот способ позволяет сократить период культивирования до нескольких дней и, что особенно существенно, снизить риск диагностических ошибок, обусловленных как мозаицизмом, так и контаминацией образца. Получение прометафазных и метафазных пластинок таким способом возможно из любых первичных и перевиваемых культур [166]. К сожалению, дорогостоящее оборудование и трудоемкость препятствуют широкому внедрению этого прогрессивного метода в клиническую практику.

Неудачи карiotипирования по КАЖ во многом обусловлены качеством реактивов (питательные среды, сыворотки, стимуляторы роста клеток) и недостатком опыта работы по культивированию выростающих клеток [67].

Следует также отметить, что в случае беременности плодом женского пола при наличии только культур КАЖ невозможно установить число ошибочных диагнозов, обусловленных контаминацией материнскими клетками. Обычно частота таких ошибок при культивировании КАЖ составляет 0,16%, а при культивировании клеток ворсин хориона она может достигать 0,4% [334, 896].

Учитывая высокую эффективность карiotипирования плода на прямых препаратах из ворсин хориона или плаценты (99,4%), мы считаем неоправданным использование КАЖ в качестве единственно возможного образца плодного материала для цитогенетического анализа. Отсутствие в России специальных питательных сред для культивирования клеток хориона (плаценты) является серьезным препятствием для карiotипирования плода по КАЖ в отечественных диагностических центрах.

В настоящее время препараты некультивированных КАЖ используются для получения детальной информации о карiotипе плода методом FISH при верификации гетеропloidии, установленной по клеткам другого происхождения (хорион/плацента, лимфоциты пуповинной крови) (рис. 4.20).

Важное применение КАЖ находят в настоящее время для диагностики наиболее частых хромосомных болезней методом количествен-

ной флуоресцентной полимеразной цепной реакции — Quantitative Fluorescent PCR (QF-PCR) (см. главу 9).

4.5.3. Лимфоциты пуповинной крови плода

Попытки получения крови плода во время беременности были впервые предприняты с целью диагностики гемоглинопатий, при этом кровь плода получали при помощи множественных пункций плаценты [537]. Однако высокая (10%) частота гибели плода, а также неизбежная контаминация материнской кровью не позволяли рекомендовать такой способ для пренатальной диагностики. После разработки методики получения крови при пункции пуповины под ультразвуковым контролем [346] проблема исследования крови у плода была практически решена. При кордоцентезе извлекается обычно не более 3 мл крови, что составляет около 10% от ее общего фетоплацентарного объема во II триместре беременности. Кордоцентез выполняют, начиная с 18–19-й недели как в диагностических целях [87, 707, 848], так и для внутриутробного лечения гемолитической болезни [112].

Одной из проблем пренатальной цитогенетической диагностики лимфоцитов является контаминация образца амниотической жидкостью или материнской кровью. В последнем случае возможны серьезные диагностические ошибки. Решение этой проблемы относится к технике проведения кордоцентеза. Разработанная в НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН 2-игольная методика пункции вены пуповины на ее свободном участке [112] позволяет получать образцы крови плода без примесей. Контроль за чистотой образца проводится в соответствии с методиками, основанными на отличиях фетального гемоглобина от гемоглобина взрослых эритроцитов [65, 234].

Для хромосомного анализа крови плода используют стандартную методику стимулирования лимфоцитов фитогемагглютинином (ФГА). Использованные нами варианты культивирования лимфоцитов пупо-



Рис. 4.20. FISH с ДНК-зондом D18Z1 на препаратах некультивированных амниоцитов

винной крови [16, 192] позволили провести успешную цитогенетическую диагностику в 99,8 % случаев. Единичные неудачи при культивировании обычно обусловлены гемолизом эритроцитов, полученных от плодов с тяжелой формой гемолитической болезни.

Таким образом, лимфоциты, имеющие исключительно плодное происхождение, дают наиболее адекватное представление о хромосомном статусе плода. Поэтому кордоцентез может быть рекомендован для уточнения кариотипа плода при обнаружении хромосомного мозаицизма в плаценте, а также как основной способ получения материала при наличии пороков развития у плода не только во II, но как показывает наш опыт, и в III триместре беременности (см. главу 9).

4.6. Принципы изучения генеза хромосомных аномалий в постимплантационном и постнатальном периодах онтогенеза

Регистрация генных, хромосомных и геномных мутаций в постнатальном периоде развития человека обычно ограничена исследованием образцов периферической крови.

Разработанный еще в 1960 году [310] метод приготовления препаратов из ФГА-стимулированных лимфоцитов является основным в клинической цитогенетике. Как правило, для кариотипирования используют дифференциальные GTG и CBG окраски. В некоторых лабораториях предпочитают Q- или R-окрашивание. Гораздо реже применяются специальные методы (анализ прометафазных хромосом, репликационные варианты дифференциальной окраски, выявление ЯОР и др.). Широкую популярность завоевал метод FISH, особенно M-FISH, который используется, в основном, для идентификации маркерных хромосом и структурных aberrаций. Благодаря развитию этого метода возникло новое направление исследований — интерфазная цитогенетика, достижения которой могут быть использованы в клинической практике для установления формы гетероплоидии (мозаичной или полной) с использованием образцов других тканей (буккальный эпителий, фибробласты кожи, ткани гонад и т. д.). Другие молекулярно-цитогенетические методы (PRINS, CGH, SKY и их разновидности) имеют более ограниченное применение и используются, в основном, при идентификации структурных aberrаций [167].

Разработанная недавно технология, позволяющая получить библиотеку ДНК из материала трудно идентифицируемого хромосомного фрагмента путем его микродиссекции непосредственно на хромосомном препарате, является одним из наиболее информативных и экономичных методов для установления природы хромосомной перестройки. Мечение такой ДНК с последующей гибридизацией на контрольных хромосомных препаратах позволяет практически во всех случаях провести точную идентификацию aberrантной хромосомы и даже оценить связана ли конкретная перестройка с потерей или приобретением дополнительного хромосомного материала [167].

Комплекс методов ДНК-анализа (PCR, блот-гибридизация, SSCP, анализ гетеродуплексов и др.) применяют не только для детекции генных мутаций, но и для детального исследования аномального кариотипа и установления механизмов возникновения хромосомных aberrаций. В частности, на основе изучения полиморфных локусов ДНК подтверждены цитогенетические наблюдения о высокой частоте возникновения анеуплоидии в оогенезе, показана решающая роль аномальной мейотической рекомбинации в нерасхождении хромосом (см. главу 3).

Основные принципы и методические подходы, разработанные для анализа механизмов возникновения мутаций с использованием образцов биоматериала от индивидов в постнатальном периоде, приемлемы и для исследований с использованием материала плодного происхождения. С учетом специфики получения плодного материала следует отметить, что в качестве материала для метода PCR, как нами было показано ранее [156, 513], могут быть использованы соскобы фиксированных клеток хориона с препаратов, ранее использовавшихся для цитогенетической диагностики.

Кратко рассмотрим методические подходы, используемые для установления происхождения гетероплоидии и структурных aberrаций хромосом у постимплантационных зародышей. Следует подчеркнуть, что изучение механизмов возникновения хромосомных aberrаций, регистрируемых до или после рождения, носит ретроспективный характер. Методология таких исследований основана на установлении характера мутации (геномная, хромосомная), ее формы (полная, мозаичная) и определении стадии возникновения. Если для идентифи-

кации мутации используется доступный биологический материал, то выяснение происхождения хромосомной аномалии неизбежно влечет цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование образцов биоматериала от его родителей.

4.6.1. Происхождение гетероплоидии

Выяснение генеза добавочных хромосом при трисомии и триплоидии, а также конкретизация стадии мейоза или митоза, на которой произошло нерасхождение гомологов, основано на сравнительном анализе структурного гетерохроматина и ДНК-полиморфизмов. Если первые исследования по установлению родительской принадлежности экстрахромосом были проведены исключительно цитогенетическими методами, то использование ДНК-маркеров соответствующей хромосомы открыло новые возможности для анализа механизмов мейотического нерасхождения, связанных с аномальной рекомбинацией [318].

Молекулярному анализу к настоящему времени подвергнуто более 1000 случаев различных трисомий. Наиболее полно (более 750 информативных случаев) изучена трисомия 21 [638, 676]. Доминирует материнское происхождение, составляя 90–95 %, однако не во всех случаях удалось установить стадию мейоза, когда произошло нерасхождение. Это было обусловлено отсутствием прицентромерного полиморфизма, специфичного для хромосомы 21.

Полученные результаты подтверждают возможность использования ПЦР-анализа коротких tandemных повторов (КТП) для изучения нерасхождения хромосом. Однако вопреки ожиданиям, его эффективность оказалась не очень высокой. Очевидно, что увеличение числа тест-систем на основе КТП, локализованных в различных районах изучаемых хромосом, позволит решить проблему установления родительской принадлежности дополнительных хромосом набора, а также позволит учесть частоту рекомбинации. При интерпретации результатов ПЦР-анализа необходимо учитывать удаленность тестируемых КТП от центромерного района (табл. 4.3). Комбинированный ПЦР и цитогенетический анализ, при котором регистрируется полиморфизм по коротким плечам акроцентриков (рис. 4.21), в которых рекомбинация происходит относительно редко, представляется наиболее перспективным для установления механизма возникновения наиболее рас-

Таблица 4.3. Принципиальный подход к установлению стадии нерасхождения хромосом с использованием ДНК-полиморфизма [514]

Деление	Статус полиморфизма		
	Центромерный	Проксимальный	Дистальный
Первое деление мейоза			
– Отсутствие кроссинговера	Гетерозиготный	Гетерозиготный	Гетерозиготный
– Кроссинговер	Гетерозиготный	Гетерозиготный	Гетерозиготный
Второе деление мейоза	Гомозиготный	Гомозиготный	Гетерозиготный
Дробление зиготы	Гомозиготный	Гомозиготный	Гомозиготный

пространенных трисомий 21 и 13. Как уже упоминалось (см. выше), в настоящее время разработаны удобные молекулярные тест-системы для пренатальной диагностики частых анеуплоидий методом QF-PCR. С этой целью используются наборы высокополиморфных ДНК-маркеров на хромосомы 13, 18, 21 и X (в среднем по 3–4 маркера на хромосому). В качестве маркеров служат трех- и четырехнуклеотидные тандемные повторы с высоким уровнем вариабельности. С помощью автоматического секвенатора ABI-300 удается не только выявить наличие лишней хромосомы, но также определить ее родительское происхождение и выяснить стадию мейоза, на которой произошло нерасхождение (см. главу 9).

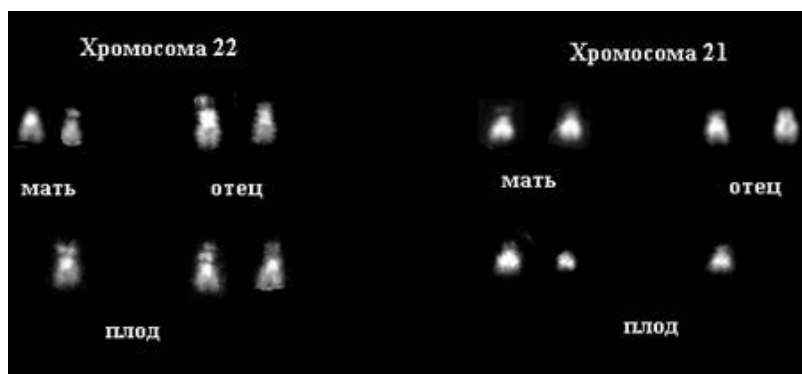


Рис.4.21. Использование структурного полиморфизма коротких плеч хромосом группы G для установления происхождения добавочных хромосом в клетках цитотрофобласта хориона при анэмбрионии (кариотип плода 48,XY,+21 (mat),+22 (pat))

4.6.2. Происхождение хромосомных мутаций

В зависимости от хромосом, участвующих в перестройке, методы идентификации ее родительского происхождения могут быть различными.

Так, наличие материала Y-хромосомы в любом из вариантов перестроек *de novo* однозначно свидетельствует о ее происхождении в сперматогенезе (рис. 4.22, 4.23). Однако точная локализация точек разрыва, равно как и идентификация хромосомных маркеров, возможна лишь при использовании комплекса методов: традиционного кариотипирования и специальных методов анализа. Например, дифференциальная деконденсация гетерохроматина, методы RBA и FPG в сочетании с методом FISH, а также ПЦР-анализ [343, 898] доказывают перспективность такого комплексного подхода при анализе аномалий в системе половых хромосом.

Точное родительское происхождение структурных aberrаций может быть установлено лишь при использовании полиморфных локусов ДНК. Напомним (см. главу 3), что большинство структурных перестроек, возникающих *de novo* (изохромосомы, Робертсоновские и реципрокные транслокации, делеции, инверсии, дупликации, центрические и ацентрические фрагменты и пр.) (рис. 4.24), уникальны и, соответственно, требуют индивидуального подхода к установлению механизмов их происхождения.

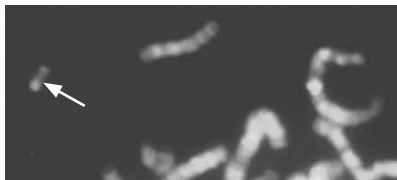


Рис. 4.22. Структурная перестройка Y-хромосомы. Кариотип плода 46,X,t(Y;15)(q12;q12). Фрагмент метафазной пластинки из клетки цитотрофобласта хориона. Окраска QFH/AcD.

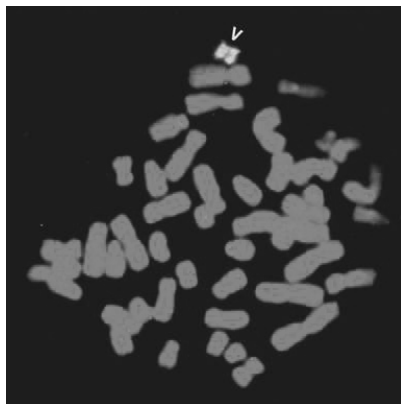


Рис. 4.23. Структурная перестройка Y-хромосомы у пациентки с синдромом Шерешевского–Тернера (кариотип 46,X,idel(Yp)). ФГА-стимулированные лимфоциты периферической крови. FISH с ДНК-зондом DYZ3

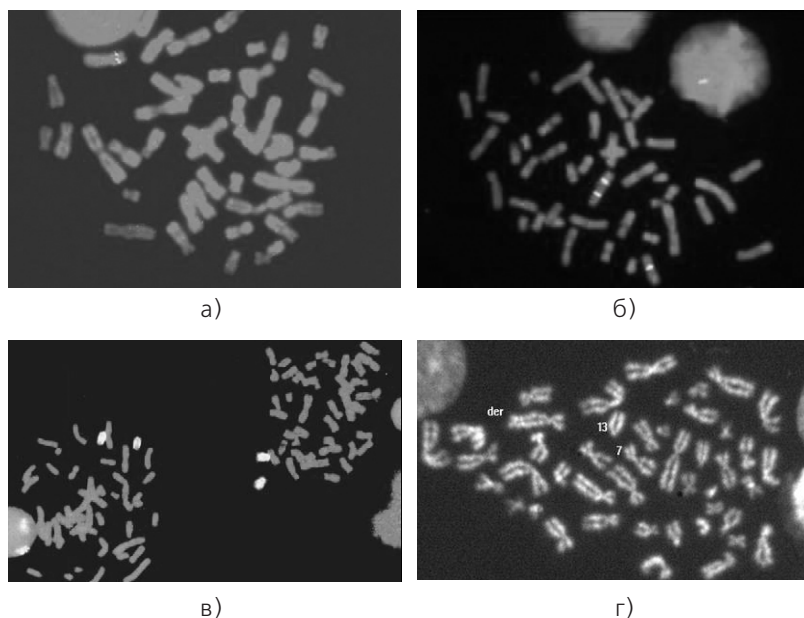


Рис. 4.24. Структурные перестройки хромосом. ФГА-стимулированные лимфоциты периферической крови (а–в) и цитотрофобласт (10 недель беременности) (г): а — del(Xp21::?) (FISH с локус-специфическим ДНК-зондом); б — dic(X) (FISH с ДНК-зондом DXZ1); в — 46,XX/47,XX,+der(18) (FISH с целнохромосомным ДНК-зондом 18); г — 45,XX,der(7;13) (окраска QFН/АсD)

Заключение

Таким образом, современные цитогенетические методы исследования, дополненные при необходимости методами ДНК-анализа, позволяют проводить изучение геномных и хромосомных мутаций на разных этапах онтогенеза человека и достаточно точно устанавливать механизмы их возникновения. В зависимости от стадии развития набор таких методов может быть различным. Каждый из рассмотренных подходов имеет свои недостатки и преимущества. Наиболее перспективным для цитогенетики развития человека является комплексный подход, основанный на объединении основных принципов цитогенетики гаметогенеза, пре- и постимплантационной диагностики и клинической цитогенетики. Прогресс способов получения материала плода для прижизненных лабораторных исследований предоставляет такую уникальную возможность.

ГЛАВА 5

ЧАСТОТА И СПЕКТР ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ В ГАМЕТОГЕНЕЗЕ И НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Введение

Хромосомные аномалии могут возникать на любой стадии онтогенеза. Последствия несбалансированных нарушений генома для развивающегося организма особенно драматичны, когда такие нарушения происходят еще в гаметах, во время оплодотворения или на ранних стадиях дробления. При этом хромосомные аномалии, характерные для про- и преэмбрионального периодов развития человека, имеют свои качественные и количественные особенности. Последние обусловлены специфическими пространственными и временными особенностями созревания мужских и женских гамет (глава 1), различной эффективностью презиготической селекции генетически неполноценных гамет в оогенезе и сперматогенезе, а также селекции несбалансированных геномов до имплантации и в процессе дальнейшего развития.

5.1. Хромосомные аномалии в гаметогенезе

Преобладающее большинство геномных и хромосомных мутаций возникает в мейозе. Многие из них оказываются летальными и приводят к гибели зиготы на самых ранних стадиях ее развития. Поэтому оценка частоты возникновения хромосомных аномалий в гаметогенезе, которая основана на результатах непосредственного анализа хромосомного набора гамет, представляется наиболее корректной.

5.1.1. Сперматогенез

Как уже отмечалось (см. главу 4), сведения о частоте спонтанных хромосомных аномалий в зрелых сперматозоидах человека могут быть получены при помощи метода FISH либо путем прямого анализа хромосомного набора мужского пронуклеуса после гетерологичного оплодотворения (см. 4.2.2.3).

Основные итоги хромосомного анализа методом FISH с маркированием всех хромосом, за исключением хромосом 19 и 22, позволяют утверждать, что частота гетероплоидных сперматозоидов в норме не превышает 1,5% [451]. Установлено также, что участие разных хромосом в образовании анеуплоидных сперматозоидов не равноценно. Так, у клинически здоровых доноров частота гетероплоидных сперматозоидов, определенная с помощью ДНК-проб, специфичных к прицентромерным районам хромосом 7 и 18, варьирует в пределах 0,61–0,81% [420]. Поскольку одноцветная FISH не позволяет отличить дисомные по какой-либо хромосоме сперматозоиды от диплоидных, полученные результаты отражают их суммарную частоту, которая соответствует опубликованным данным для клинически здоровых доноров спермы. Наиболее подвержены нерасхождению хромосомы 1, 9, 16, 21, X и Y [451].

При исследовании в общей сложности более 3 млн спермиев показано, что частота дисомных по разным хромосомам сперматозоидов варьирует в широких пределах у различных групп доноров и пациентов. Существенно, что у пациентов с аномальными морфофункциональными параметрами спермограммы доля гетероплоидных сперматозоидов значительно выше, чем у доноров спермы, причем такая зависимость имеет линейный характер [4].

Методом гетерологичного оплодотворения проанализировано в общей сложности более 20 тысяч хромосомных комплектов зрелых сперматозоидов от здоровых доноров в возрасте от 18 до 65 лет [451]. В этих исследованиях было установлено, что соотношение X- и Y-несущих сперматозоидов у здоровых доноров соответствует теоретически ожидаемому 1:1, а наличие хромосомных aberrаций не сказывается на подвижности и оплодотворяющей способности сперматозоидов. При этом частота структурных хромосомных aberrаций в зрелых сперматозоидах здоровых мужчин составляет 6–7%, а частота анеуплоидии 1–4% [536, 770]. Индивидуальная частота хромосомных aberrаций

у доноров варьирует от 12–20%. При этом их большая часть (до 13%) приходится на структурные aberrации, а самым частым типом аномалий (до 50%) являются хромосомные разрывы. Далее, в порядке убывания, встречаются ацентрические фрагменты, хромосомные пробелы, дицентрические и маркерные хромосомы, изохромосомы, транслокации, делеции, дупликации и комплексные хромосомные перестройки. Частота и спектр структурных перестроек не зависят от индивидуальных особенностей, а также от условий капацитации [451]. Единственным фактором, увеличивающим частоту aberrаций, оказался возраст донора [224, 312]. При этом влияние возраста было показано только для структурных aberrаций, но не для численных аномалий [451]. Факторы, влияющие на частоту хромосомных aberrаций, возникающих в мейозе, более подробно рассмотрены в главе 6.

Частота анеуплоидных сперматозоидов у здоровых мужчин составляет в среднем 1–4%, при этом гипогамплоидия превалирует над гипергамплоидией (3,3 и 1,7% соответственно) [451]. Несоответствие частот гипер- и гипогамплоидных сперматозоидов, по-видимому, обусловлено артефактной утратой хромосом в процессе приготовления препаратов, причем чаще утрачиваются мелкие хромосомы и хромосомы из многочисленной группы C (большие субметацентрические хромосомы 6–12).

Суммарные результаты нескольких масштабных исследований [223, 598] свидетельствуют о том, что частота нерасхождения хромосом 21, X, Y, 1, 9 и 16 повышена по сравнению с другими хромосомами, тогда как дисомии 6 и 17 не отмечены ни в одном из 17998 сперматозоидов, исследованных после гетерологичного оплодотворения. Обращает на себя внимание, что хромосомы с увеличенными гетерохроматиновыми районами (1, 9, 16, Y) чаще других подвержены нерасхождению [451]. Эти результаты подтверждают гипотезу о гетерохроматине как факторе, влияющем на расхождение хромосом [354]. В то же время районы ядрышковых организаторов не оказывают заметного влияния на сегрегацию хромосом, за исключением хромосомы 21. Частота сперматозоидов с анеуплоидией по ядрышкообразующим хромосомам групп D и G вполне сопоставима со средней частотой анеуплоидии по хромосомам других групп [451].

Одной из современных модификаций метода гетерологичного оплодотворения является метод введения спермиев человека непосредственно в овулировавшие яйцеклетки лабораторных мышей. В на-

ших экспериментах проведена инъекция подвижных сперматозоидов от 10 пациентов с нарушением фертильности в ооциты мыши. Всего проанализировано 183 метафазные пластинки мужских пронуклеусов. Суммарная частота гипергаплоидии составила 5,71 %, гипогарлоидии — 8,57%. Структурные перестройки были единичны (0,4%) и представлены маркерными, кольцевыми хромосомами и транслокацией. Таким образом, общая частота хромосомных aberrаций в зрелых сперматозоидах у мужчин с нарушением фертильности составила около 14% [193]. Эта величина несколько превышает таковую у здоровых мужчин (~ 10%), определенную в условиях гетерологичного оплодотворения (см. выше). Интересно отметить, что в отличие от здоровых доноров, доминирующим типом хромосомных aberrаций в сперматозоидах у пациентов с нарушением фертильности оказалась анеуплоидия (трисомии и моносомии). Преобладание анеуплоидии в наших исследованиях отчасти обусловлено использованием для инъекций спермиев с аномальной морфологией головки (78 из 183), что косвенно указывает на их пониженную оплодотворяющую способность.

Таким образом, данные различных методов исследования свидетельствуют о том, что у здоровых мужчин до 10% сперматозоидов несут хромосомную аномалию, причем структурные перестройки встречаются чаще, чем численные.

5.1.2. Оогенез

В отличие от сперматогенеза, где уже реальна объективная оценка частоты спонтанных хромосомных aberrаций в зрелых гаметах, данные об их частоте в оогенезе пока ориентировочны. Прежде всего, это связано с тем, что полноценный цитогенетический анализ женских гамет возможен только в ооцитах на стадии метафазы II, полученных в условиях ЭКО. Кроме того, в этих исследованиях обычно используют яйцеклетки, непригодные для оплодотворения *in vitro*, уже имеющие признаки дегенерации. Наконец, для оценки частоты гетероплоидии в ооцитах иногда используют косвенный подход, основанный на результатах цитогенетического анализа 1-го или 2-го полярных телец.

Тем не менее, в настоящее время с помощью соответствующих методических приемов (см. 4.3) получены сведения о частоте спонтанных хромосомных aberrаций и в оогенезе человека. В целом, они свидетельствуют о более высокой частоте нерасхождения хромосом в

процессе оогенеза по сравнению со сперматогенезом (см. выше). Более того, данные сравнительной цитогенетики свидетельствуют о том, что у человека уровень спонтанной гетероплоидии в оогенезе существенно выше, чем у других млекопитающих [380].

5.1.2.1. Метафаза I

В доступной литературе мы не нашли данных о частоте спонтанных хромосомных aberrаций в метафазе 1-го мейотического деления ооцитов человека. Разработка методов визуализации хромосом 1-го полярного тельца (см. 4.3.1) позволяет надеяться, что такая информация скоро будет получена [871].

5.1.2.2. Метафаза II

Большинство данных, касающихся анализа хромосом в оогенезе у человека, получено на препаратах ооцитов, не оплодотворившихся в культуре *in vitro* и заблокированных на стадии метафазы второго деления мейоза (МII). Анализ данных литературы позволяет сделать вывод о высокой частоте и широком диапазоне различных типов хромосомных аномалий в ооцитах человека в МII. Так, частота ооцитов, несущих одну или более хромосомную aberrацию, в разных сериях исследований варьирует от 4% [386] до 58% [897]. Значительная вариабельность полученных результатов может быть обусловлена как методами приготовления хромосомных препаратов, существенно влияющих на качество метафазных пластинок, так и трудностями идентификации и подсчета конденсированных хромосом. Нельзя не отметить и отсутствие унифицированного подхода к отбору ооцитов и метафазных пластинок для анализа.

Однако результаты многочисленных зарубежных исследований [302, 424, 574, 905], а также собственные данные [36, 37] свидетельствуют о высоком уровне спонтанной анеуплоидии в ооцитах на стадии МII и подтверждают тенденцию к ее увеличению с возрастом женщины. Так, в наших исследованиях из 133 овулировавших ооцитов человека, пригодных для цитогенетического анализа на стадии МII, 30 оказались анеуплоидными, причем частота гипер- и гипогамплоидии была одинаковой (14 и 16 ооцитов соответственно), что косвенно свидетельствовало об адекватности использованного метода приготовления хромосомных препаратов. В 19 случаях (63,3%) в образова-

нии анеуплоидных ооцитов принимали участие отдельные хроматиды (табл. 5.1). Не исключено, что их наличие обусловлено преждевременным разделением центромер или так называемым «предделением» [424], которое встречается на этой стадии с частотой до 30% [574]. Так как практически все исследования проведены на ооцитах с признаками дегенерации, нельзя исключить, что преждевременное разделение центромер было обусловлено именно этим обстоятельством [449], либо связано с методическими артефактами. Однако существование такого механизма нерасхождения хромосом в оогенезе доказано в прямых экспериментах на мышцах в условиях применения оокадаевой кислоты — препарата, вызывающего преждевременную спирализацию хромосом [55, 57].

Частота диплоидных ооцитов в нашем исследовании составила 9% (табл. 5.1). При этом в 11 случаях 1-е полярное тельце отсутствовало, а в одном ооците с кариотипом 46,XX было обнаружено дегенерировавшее полярное тельце, содержащее диплоидный набор хромосом, что доказывало его происхождение из тетраплоидного оогония. Диплоидные ооциты, возникающие из тетраплоидных оогониев вследствие нарушения цитотомии или в результате слияния двух оогониев встречаются достаточно редко [52]. По-видимому, основной причиной образования диплоидных ооцитов является блокада анафазы I, которая приводит к персистенции в ооплазме второго диплоидного набора хромосом.

Структурные аномалии хромосом обнаружены в 10 ооцитах, причем во всех случаях они сочетались с анеуплоидией (табл. 5.1). К сожалению, попытки идентифицировать структурные aberrации оказались безуспешными.

Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами аналогичных исследований, проведенных в Великобритании. При кариотипировании 1397 ооцитов на стадии МII в 151 (11%), была выявлена анеуплоидия, причем более чем в половине случаев она была обусловлена преждевременным делением центромеры, результатом чего было появление непарных (лишних) хроматид [614]. В этих же исследованиях была четко установлена прямая корреляция частоты хромосомных aberrаций в ооцитах МII с возрастом женщины. У женщин моложе 27 лет она составляла около 7,4%, тогда как у женщин старше 39 лет достигала 39% [603].

Таким образом, частота хромосомных aberrаций, регистрируемая в оогенезе на стадии метафазы второго мейотического деления, очень

Таблица 5.1. Результаты цитогенетического анализа ооцитов человека на стадии метафазы II, не оплодотворившихся в условиях культуры

	Кариотип	Число ооцитов
Норма	23,X	79
Гипергаплоидия (n = 14)	26,X,+D,+E,+E,+Fcht,+Gcht	1
	26,X,+C,+C,+G,+Ccht,+Ccht	1
	26,X,+B,+C,+E	1
	24,X,+C	4
	24,X,+E	2
	24,X,+G	2
	24,X,+C,+Ccht	1
	23,X,+Echt,+Echt	1
	23,X,+Acht,+Acht	1
Гипогаплоидия (n = 16)	19,?X,-C,-E,-F,-F	1
	19,X,-D,-F,-G,-G	1
	20,?X,-C,-E,-E	1
	20,?X,-C,-D,-D,+Ccht	1
	21,?X,-C,-E,+Gcht	1
	21,?X,-C,-C,+Acht,+Acht,+Ccht	1
	21,X,-D,-E	1
	21,X,-F,-F	1
	21,X,-D,-G	1
	22,X,-A	1
	22,?X,-C	1
	22,X,-E,+Echt,+Echt	1
	22,X,-G	4
	Сочетания нуллисомий и дисомий (n = 8)	30,X,+C,+C,+D,+D,+D,+E,+E,-F,+G
25,?X,-C,-C,+D,+D,+E,+E,+Echt,+Echt		1
24,X,+C,+D,-G,+Gcht		1
23,X,+D,-G,+Gcht		1
22,X,-A,+D,+D,-F,-G,+Acht,+Acht,+Acht		1
21,?X,-C,-C,-C,+D,+D,-E,+Echt,+Echt		1
21,X,+C,-D,-E,-E		1
20,X,+C,-E,-E,-E,-F		1
Структурные аномалии (n = 10)	25,X,+D,+G,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5	1
	25,X,+C,+D,+Fcht,+mar1,+mar2	1
	24,X,+F,+Ccht,+mar1,+mar2	1
	24,X,+derB	1
	24,X,+A,+C,-E,+Echt,+Echt,+mar1	1
	23,X,+Acht,+mar1	1
	22,?X,der(B),-C,-C,+D	1
	21,X,-E,-F,+Echt,+Echt,+mar1,+mar2	1
	19,?X,-C,-E,-G,-G,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4	1
	18,?X,-C,-D,-D,-F,-G,+mar1,+mar2	1
Полиплоидия (n = 13)	46,XX	6
	44-47<2n>,XX	6
	85-93<4n>,XXXX	1

высока и по некоторым данным затрагивает почти половину всех ооцитов, завершивших первое деление созревания. Их большая часть, по-видимому, не способна дать начало жизнеспособному потомству. Однако многие из них могут быть оплодотворены и завершают второе мейотическое деление. Следует подчеркнуть, что практически все исследования проведены на яйцеклетках, имеющих признаки дегенерации, а потому не использованных в программе ЭКО. Возможно, именно этим можно отчасти объяснить столь высокую частоту хромосомных aberrаций в метафазе II.

5.1.2.3. Завершение мейоза

Прямые данные о частоте спонтанных хромосомных aberrаций в ооцитах, завершивших 2-е деление мейоза, могут быть получены только после оплодотворения, когда происходит отделение 2-го полярного тельца (см. 4.3.2). При этом объектом исследования могут быть хромосомы женского пронуклеуса на стадии метафазы 1-го деления дробления, либо хромосомы 2-го полярного тельца (ВПТ).

К сожалению, как показывает анализ литературы, прямые данные о частоте хромосомных aberrаций в ооцитах человека, завершивших мейоз, до настоящего времени отсутствуют. Вместе с тем, при определении родительского происхождения анеуплоидии у плодов человека и новорожденных с использованием цитогенетических и молекулярных маркеров установлено, что около 20% случаев анеуплоидии обусловлено нерасхождением хромосом во 2-м делении созревания ооцита [449]. Определенная информация на эту тему может быть получена при анализе ВПТ. Однако трудности визуализации таких хромосом на обычных цитогенетических препаратах значительно снижают ценность подобных исследований (см. 4.3.2). В пилотных исследованиях с применением метода FISH было установлено, что частота анеуплоидных ВПТ составляет около 25% [715, 725]. В какой мере эта величина отражает истинную частоту нерасхождения хромосом во 2-м делении созревания и суммарную частоту спонтанных хромосомных aberrаций в оогенезе остается неизвестным.

Следует подчеркнуть, что для корректной оценки истинной частоты аномальной сегрегации хромосом в оогенезе требуются одно-временные исследования хромосомного набора в ооците и полярных тельцах. В экспериментах на ооцитах китайских хомячков показано,

что при запаздывании хромосом в анафазе гипогиплоидными могут оказаться как полярное тельце, так и ооцит [628]. Исследования подобного рода на ооцитах человека единичны и ограничены FISH-анализом отдельных хромосом [725]. Однако возможности метода FISH с использованием хромосомспецифических ДНК-зондов ограничены анализом отдельных хромосом. Следовательно, многие анеуплоидии и практически все структурные aberrации, возникшие *de novo*, не регистрируются, что приводит к занижению реальной частоты возникновения хромосомных aberrаций. Можно надеяться, что более точную информацию о частоте спонтанных хромосомных аномалий в оогенезе человека удастся получить с помощью разработанных в настоящее время новых подходов к цитогенетическому анализу 2-го полярного тельца (см. раздел 4.3.2) [415, 874].

Таким образом, частота спонтанных хромосомных aberrаций в оогенезе человека изучена недостаточно. Имеются ориентировочные данные о ее необычно большой величине (до 50 %) в метафазе II мейоза и до 25 % после завершения мейоза. Однако, учитывая труднодоступность материала, высокую частоту артефактов при приготовлении препаратов и анализе единичных метафазных пластинок, а также несовершенство методов хромосомного анализа, эти данные следует рассматривать как предварительные.

5.2. Хромосомные аномалии в эмбриогенезе

Сравнительный анализ хромосомных aberrаций у человека на разных этапах онтогенеза однозначно свидетельствует о существовании прямой зависимости их частоты от стадии развития. Такая динамика очевидна при сопоставлении результатов цитогенетических исследований спонтанных абортусов и новорожденных (70 и 0,5 % соответственно). За последние годы, благодаря внедрению в практику методов пренатальной диагностики, накоплен обширный материал, анализ которого позволит представить более реальную картину частоты хромосомных aberrаций у человека.

5.2.1. Доимплантационные стадии развития

Частота спонтанных хромосомных аномалий у эмбрионов человека доимплантационного периода (1–6-й дни развития, см. раздел 1.3) достаточно велика и варьирует от 5 % [220] до 100 % [654]. При этом среди мор-

фологически неполноценных эмбрионов гетероплоидия достигает 86,6% [704]. Прослеживается заметная зависимость гетероплоидии от возраста матери. У 20–34-летних женщин частота гетероплоидных эмбрионов с нормальной морфологией составляет 16%, у 35–39-летних — 37%, а у 40–45-летних — 53% [719]. Некоторое увеличение частоты гетероплоидии (53–54%) отмечается при привычном невынашивании [244]. Немаловажно, что при ICSI (инъекция сперматозоида или сперматиды в цитоплазму яйцеклетки) частота гетероплоидных эмбрионов также может возрастать, что, по-видимому, обусловлено увеличением частоты диплоидных мужских гамет при олигозооспермии [654].

Опубликованные данные свидетельствуют о высокой частоте гетероплоидии у ранних зародышей человека. Однако в большинстве случаев гетероплоидия на стадии 8–12 клеток представлена мозаичной формой, что, возможно, является особенностью нормального эмбриогенеза человека (см. ниже). Следует также отметить, что аномальные эмбрионы, в том числе и гетероплоидные, могут оказаться не способными к развитию после трансплантации и погибнуть до или в процессе имплантации (средняя частота имплантации в программе ЭКО ~ 25–40%).

Наиболее обстоятельные исследования кариотипа у доимплантационных зародышей человека с применением традиционных методов хромосомного анализа выполнены на 816 дробящихся зародышах [521] и 447 зародышах на стадии бластоцисты [342]. В первом исследовании прокариотипировано 195 зародышей (23,9%) и определена ploидность у 325 (39,8%), во втором — у 182 зародышей (40,7%) и установлена ploидность у 304 (68%).

Суммируя имеющиеся данные, следует отметить необычно высокую по сравнению с другими млекопитающими [56] частоту (40–60%) геномных мутаций [331, 340]. При этом в зависимости от кариотипа все доимплантационные зародыши человека можно подразделить на 5 типов: 1) полиploидные, 2) эуплоидные, 3) гетероплоидные (полная форма), 4) мозаичные гетероплоидные, 5) неопределенные (бластомеры отличаются по числу и набору хромосом).

5.2.1.1. Полиploидия

Большая часть аномалий кариотипа в период дробления связана с нарушениями ploидности. *Триploидия* как следствие диспермии является наиболее частой патологией оплодотворения в условиях *in vitro* и

регистрируется по наличию трех пронуклеусов в зиготе [654]. В случаях, когда наличие и число полярных телец, а также пронуклеусов вызывает сомнения, невозможно отличить диспермию (3 пронуклеуса + 2 полярных тельца) от дигинии (3 пронуклеуса + 1 полярное тельце) [703]. Триплоидные зиготы непосредственно после первого деления дробления, как правило, образуют три и более клеток, и реже — две [551]. В дальнейшем 3-клеточные эмбрионы чаще образуют мозаичные формы полиплоидии, чем 2- или 4-клеточные [654]. Происхождение триплоидии также определяет судьбу дробящегося зародыша. Так, можно считать доказанным, что у дигинетических триплоидов хромосомы всех трех пронуклеусов образуют единое двухполюсное веретено и имеют одну активную центросому [654]. У диспермных триплоидов первое митотическое деление осуществляется, по-видимому, путем образования трехполюсного веретена [358]. В дальнейшем аномальная сегрегация хромосом может приводить к истинной триплоидии либо к формированию мозаиков (рис. 5.1). Мозаицизм ($1n/2n$, $2n/3n$) может быть также обусловлен асинхронностью формирования пронуклеусов и ошибками репликации ДНК в первом митотическом цикле [377, 378, 455]. Частота триплоидных зародышей на ранних стадиях дробления [521], на стадии бластоцисты [342] и в биоптатах ворсин хориона первого триместра [155, 344] примерно совпадает и составляет в среднем около 2,5%. Эти наблюдения указывают на отсутствие селекции против триплоидных зародышей.

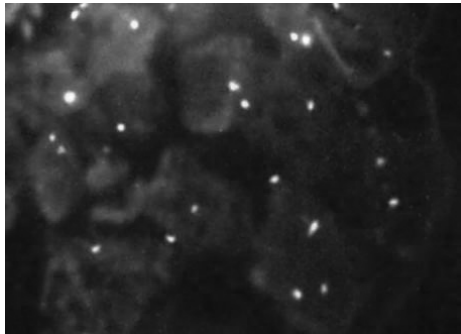


Рис. 5.1. Мозаичная бластоциста, возникшая из 3-пронуклеарной зиготы. FISH с прицентромерным зондом *D18Z1*

Другой формой полиплоидии у зародышей человека является *тетраплоидия*, которая встречается в единичных случаях вплоть до стадии бластоцисты. Форма тетраплоидии (истинная или мозаичная $2n/4n$ и, возможно, $1n/4n$ и $3n/4n$) остается неизвестной. Не вызывает, однако, сомнения, что истинно тетраплоидные зародыши, если и возникают,

то подвергаются элиминации уже во время имплантации, о чем свидетельствуют многочисленные данные по кариотипированию зародышей в I триместре беременности [151, 155, 344, 871].

Характерным для зародышей человека на стадии бластоцисты является появление большого числа (30–40%) диплоидно-тетраплоидных мозаиков [342]. Высказано предположение, что мозаицизм $2n/4n$ отражает процесс полиплоидизации в клетках трофобласта, предшествующий его активной инвазии клеток эндометрия в период имплантации зародыша в стенку матки [68].

Появление гаплоидных бластомеров может быть вызвано редукционным делением диплоидного ядра [455]. Единичные гаплоидные зародыши зарегистрированы только в период дробления (8–10 бластомеров) и не встречаются на стадии бластоцисты [342], что свидетельствует об их элиминации еще в доимплантационном периоде.

5.2.1.2. Анеуплоидия

Зародыши с дефицитом (моносомия) или избытком (трисомия) отдельных хромосом возникают, главным образом, вследствие оплодотворения яйцеклетки с хромосомным дисбалансом. Этот вывод основан на сопоставлении общей частоты анеуплоидии и анеуплоидии по различным ауто索мам в ооцитах и у дробящихся зародышей [654]. Вместе с тем, сведения о частоте анеуплоидных зародышей противоречивы. Так, по некоторым данным [521], на ранних стадиях дробления частота анеуплоидии составляет 20%, однако, может достигать 40%, а с учетом мозаичных вариантов — даже 80% [653].

Предполагают, что такие «качества» эмбриона как скорость дробления, степень фрагментации, наличие многоядерных бластомеров, диссоциации их размеров могут отражать его хромосомный статус. Так, до 89% зародышей с высокой степенью фрагментации оказываются мозаичными, и около 71% эмбрионов, остановившихся в развитии на стадии нескольких бластомеров, обнаруживают хромосомные аномалии [654]. При этом и у морфологически нормальных зародышей частота анеуплоидных бластомеров достаточно высока и составляет около 20% [449].

Значительная часть (до 11%) анеуплоидов представлена *моносомией* хромосом, в основном, моносомией X [521]. Согласно результатам другой обстоятельной работы [342], частота анеуплоидии на стадии

бластоцисты составляет только 3,3 %, где она представлена различными аутосомными *трисомиями*. Исключительную редкость моносомии аутосом на стадии бластоцисты отмечали и другие авторы, использовавшие для анализа метод FISH [359].

Необходимо, однако, отметить, что сравнительно недавно появилась серия публикаций, в которых была проведена идентификация анеуплоидии в материале спонтанных абортусов I триместра беременности, культура клеток которых характеризовалась плохим ростом [100, 114, 139]. Используемые в этих исследованиях метод FISH с набором меченых центромерспецифических ДНК-проб и метод сравнительной геномной гибридизации (*comparative genome hybridization CGH* — гибридизации ДНК абортуса на препаратах метафазных хромосом с нормальным кариотипом) позволяли судить о кариотипе зародыша даже в культурах клеток с очень низкой пролиферативной активностью [167]. Было установлено, что у 19% абортусов с признаками анэмбрионии (наличие оболочек при отсутствии собственно тканей эмбриона) имела место моносомия хромосом 7, 15, 21 и 22.

Таким образом, есть основания считать, что моносомия большинства аутосом несовместима с формированием бластоцисты, и такие эмбрионы погибают до имплантации. Вместе с тем, моносомия, по крайней мере, некоторых аутосом совместима с имплантацией и развитием провизорных органов, однако развитие тканей самого эмбриона прекращается уже во время имплантации или вскоре после нее (см. раздел 5.2.2).

В отличие от аутосомных моносомий, общая частота трисомии аутосом на стадии бластоцисты (5–7%) оказалась примерно такой же, как и среди эмбрионов, кариотипированных по клеткам биоптатов хориона (10–13-я недели беременности) [155, 341, 344, 727]. Любопытно, что на стадии бластоцисты зарегистрированы только 4 типа трисомии (4, 6, 9 и 22), что, по всей вероятности, связано с недостаточностью выборки [342]. По-видимому, большинство типов аутосомных трисомий у человека совместимо с развитием до стадии бластоцисты и такие зародыши сохраняют способность к имплантации (см. главу 8).

5.2.1.3. Мозаичная гетероплоидия

Мозаичная гетероплоидия является еще одной особенностью доимплантационных зародышей человека. При этом число гетероплоидных бластомеров может варьировать от нескольких клеток до поло-

вины всего эмбриона [388]. Экстраполируя результаты исследования анеуплоидии по хромосомам X, Y, 13, 18, 21, общая частота которой у морфологически нормальных эмбрионов на стадии 8 клеток с тремя и более аномальными бластомерами составляет 38–46% на весь набор, можно ожидать, что частота мозаичных эмбрионов составит до 80% [388]. Если это предположение подтвердится при дальнейших исследованиях, то хромосомный мозаицизм до 10–12-клеточной стадии, по всей видимости, отражает особенности нормального развития зародыша человека. В таком случае, мозаики, регистрируемые на более поздних стадиях эмбрионального развития и в постнатальном периоде, представляют интерес для поиска генов, мутации в которых приводят к утрате контроля за правильной сегрегацией митотических хромосом при делении бластомеров.

Таким образом, многие вопросы возникновения спонтанных хромосомных aberrаций и их влияния на раннее развитие человека до настоящего времени остаются нерешенными и требуют дальнейшего изучения. Вместе с тем, анализ уже имеющихся данных указывает на необычно высокую частоту гетероплоидии у дробящихся зародышей человека, которая может достигать 40–60%; триплоидия является наиболее частым вариантом полиплоидии; высокая частота диплоидно-тетраплоидного мозаицизма на стадии ранней бластоцисты, по всей вероятности, отражает естественный процесс полиплоидизации клеток трофобласта; характерной чертой для доимплантационных зародышей человека является высокая частота диплоидно/анеуплоидного варианта мозаицизма, биологический смысл которого не ясен; зародыши человека с моносомией любой из аутосом подвергаются элиминации в доимплантационном периоде, зародыши с моносомией X и трисомией аутосом завершают дробление, формируют бластоцисту и сохраняют способность к имплантации.

5.2.2. Постимплантационные стадии развития

Для анализа хромосомных aberrаций на постимплантационных стадиях эмбриогенеза человека используется материал спонтанных и медицинских абортусов, а также биоптаты хориона, полученные с целью пренатальной диагностики при прогрессирующей беременности. Естественно, что сведения о частоте и спектре хромосомных aberrаций, выявленных на таких образцах, сильно различаются.

Обстоятельными исследованиями, выполненными еще в 60-х годах XX века, твердо установлено, что наиболее высокие показатели гетероплоидии зарегистрированы при кариотипировании спонтанных абортусов. В таком материале частота хромосомных aberrаций может достигать и даже превышать 70 %. Так, согласно обобщенным данным, в материале зародышей, спонтанно абортированных до 10-й недели, частота хромосомных aberrаций составляет 65–70 % [268], а до 12-й недели — 35–45 % [93, 282]. Подтверждением этому могут служить и собственные данные. При анализе 88 случаев неразвивающихся (до 11-й недели) беременностей нами выявлено 48 гетероплоидных кариотипов (> 50 %), в том числе тройные и двойные трисомии и некоторые другие аномалии, которые у развивающихся эмбрионов практически не встречаются (табл. 5.2).

На более поздних стадиях эти величины снижаются. Так, между 3–4-м месяцами беременности аномалии кариотипа у спонтанных абортусов составляют уже 15–20 % [627], а к 5-му месяцу — только 3 % [268]. К моменту рождения общая частота спонтанных хромосомных аномалий находится в пределах 0,5–0,9 % [514, 694].

Таким образом, подавляющее большинство зародышей с хромосомными и геномными мутациями погибает до 20-й недели беременности [282, 694]. Эти представления легли в основу расчетов вероятности аномалий кариотипа в зависимости от срока развития плода [271, 749]. Результаты морфологического и цитогенетического анализа спонтанных абортусов [91, 93] и данные экспериментальной цитогенетики [56] убеждают в том, что гибель плодов с несбалансированным кариотипом особенно высока во время нейруляции и начале активного органогенеза, то есть до 12-й недели беременности. К концу первого триместра частота спонтанных хромосомных aberrаций быстро снижается и далее остается почти неизменной вплоть до рождения [887].

Следовательно, спонтанное прерывание беременности, особенно в ранние сроки, нередко обусловлено хромосомными аномалиями.

Значительно более низкая частота хромосомных аномалий (около 2 %) зарегистрирована у медицинских абортусов [453]. Эту величину можно считать популяционной для зародышей человека в I триместре. По-видимому, она наиболее корректно отражает истинную частоту спонтанных хромосомных и геномных мутаций у человека на 10–12-й неделях развития. Предполагается, однако, что для всех клинически

Таблица 5.2. Хромосомные аномалии при неразвивающейся беременности

	Кариотип	Число случаев
Норма	46,XX; 46,XY	40
Трисомии (n = 29)	47,XY,+2	1
	47,XX,+6	1
	47,XY,+6	1
	47,XX,+7	1
	47,XX,9ph,+9	1
	47,XX,+11	1
	47,XX,+15	1
	47,XY,+15	1
	47,XX,+16	3
	47,XY,+16	5
	47,XX+18	1
	47,XY,+20	1
	47,XX,+21	3
	47,XX, 9ph,+21	1
	47,XY,+22	2
	48,XY,+3,+21[4]/47,XY,+3[7]	1
	49,XX,+7,+15,+16	1
	48,XX,+15,+21	1
48,XY,+21,+22	1	
48,XXY,+7	1	
Моносомии (n = 6)	45,X	6
Комбинированные случаи (n = 2)	47,XX,i(18)(q10)+8	1
	47,XX,+9[17]/47,XX,+der(9)[16]/46,XX[2]	1
Структурные аномалии (n = 4)	47,XX,+mar	1
	47,XY,+mar	1
	47,XX+mar[5]/46,XX[28]	1
	47,XX,i(7)(q10),+i(7)(p10)	1
Полипloidия (n = 7)	69,XXX	2
	69,XXY	5
Всего		88

установленных беременностей эта величина примерно вдвое выше — 5% [449, 514]. Наконец, особый интерес в научном и практическом плане представляют данные о частоте хромосомных нарушений у плодов, кариотипированных в связи с высоким риском хромосомных болезней, то есть обследованных цитогенетически в рамках пренатальной диагностики. Интерес к этой группе связан с тем, что только благодаря возможностям пренатальной диагностики впервые удалось осуществить прижизненное кариотипирование плодов на разных сроках беременности и, таким образом, получить более объективную информацию о влиянии хромосомного дисбаланса на процессы эмбрионального развития. Напомним, что при спонтанных абортах в руки исследователей нередко попадает плодный материал с далеко зашедшими признаками мацерации или полностью лишенный частей самого эмбриона (так называемые «пустые плодные мешки» — «blighted ova»), непригодный для детального патоморфологического анализа.

Наша коллекция насчитывает свыше 7500 плодов, кариотипированных на разных сроках беременности в связи с пренатальной диагностикой хромосомных болезней. В общей сложности выявлено 285 плодов с хромосомной патологией (3,8%): из них 109 в I триместре беременности (3,7%), 168 — во II (3,6%) и 8 — в III (9,5%) (табл. 5.3). Из общего числа хромосомных aberrаций примерно половина представлена сбалансированными хромосомными наборами. У остальных обнаружены различные варианты хромосомного дисбаланса, в том числе мозаичные формы анеуплоидии, ограниченные плацентой.

Для более корректной оценки частоты спонтанных хромосомных aberrаций мы не учитывали плоды, родители которых являлись гетерозиготными носителями хромосомных aberrаций, включая 9qh, или мозаичных кариотипов. Из анализа нами были исключены также все случаи, в которых наследственная природа aberrации была установлена или предполагалась ее высокая вероятность. Кроме того, мы не учитывали также мозаичные формы гетероплоидии, ограниченные плацентой.

Общая частота хромосомных аномалий в наших исследованиях (3,8%) в целом соответствует опубликованной другими авторами (табл. 5.4). Отметим, что некоторая вариабельность данных, полученных в различных исследованиях, обусловлена как разным объемом выборок, так и различиями в соотношении женщин групп высокого

Таблица 5.3. Частота спонтанных хромосомных аномалий у плодов на разных постимплантационных стадиях развития человека

Тип хромосомной аномалии	Триместры беременности			Всего N = 7579
	I (N = 2923)	II (N = 4572)	III (N = 84)	
Структурные перестройки хромосом	2	2	–	4
Геномные мутации	107	166	8	281
Всего	109 (3,7 %)	168 (3,6 %)	8 (9,5 %)	285 (3,8 %)

Таблица 5.4. Частота хромосомных аномалий у плодов на разных стадиях внутри-утробного развития (по результатам пренатальной диагностики)

Ссылка	Частота, %			
	Триместр			Общая
	I	II	III	
[271]	4,2	–	–	–
[635]	1,8	–	–	–
[341]	4,6	–	–	–
[337]	2,2	1,5	–	–
[854]	4,2	–	–	–
[855]	–	2,9	–	–
[887]	5,3	6,6		2,6
[345]	2,52	1,51	–	–
[285]	–	4,7	–	–
[17]	6,7	2,5	–	–
[13]	7,3	4,3	–	–
[376]	–	4,0	–	–
Собственные данные (1987–2004 гг.)	3,7	3,6	9,5	3,8

риска, направляемых на пренатальную диагностику. К вопросу о причинах наблюдаемых различий по частоте хромосомной патологии при проведении пренатальной диагностики хромосомных болезней в разные сроки беременности мы вернемся в главе 9.

Таким образом, частота спонтанных хромосомных аномалий у человека существенно варьирует на разных стадиях онтогенеза. При этом частота геномных и хромосомных мутаций во многом определяется спецификой исследуемого материала. Каждый из подходов, используемых при анализе частот и спектров мутаций в мужских и женских

гаметах, в бластомерах дробящихся зародышей, в материале спонтанных выкидышей, медицинских абортот или нормально развивающихся плодов, предоставляет информацию, ограниченную как стадией развития, так и спецификой материала. Имеющиеся факты однозначно свидетельствуют о высокой частоте хромосомных аномалий у человека во время гаметогенеза и раннего, доимплантационного развития, когда она достигает почти половины всех исследованных образцов. Массовая гибель гетероплоидных зародышей человека, по всей вероятности, происходит в течение имплантации и раннего постимплантационного периода, которые совпадают по времени с процессами нейруляции, закладки осевого комплекса органов и началом активного органогенеза. В дальнейшем за счет элиминации генетически несбалансированных зародышей отмечается снижение частоты хромосомной патологии, которая при рождении находится в пределах 0,5–0,75 %.

5.3. Спектр спонтанных хромосомных аномалий на разных стадиях развития

Наиболее обширный спектр хромосомных aberrаций выявлен на ранних, доимплантационных стадиях развития. При цитогенетическом анализе дробящихся зародышей обнаружены практически все известные хромосомные аномалии, включая и такие, которые не встречаются или крайне редки на постимплантационных стадиях эмбриогенеза (гаплоидия, тетраплоидия, различные типы моносомий). Это означает, что зародыши с такими нарушениями кариотипа нежизнеспособны и элиминируются во время или вскоре после имплантации.

Ранние работы по анализу спонтанных хромосомных aberrаций у зародышей более поздних стадий развития, в частности, у абортированных плодов проводились с применением способов хромосомного анализа, с помощью которых были диагностированы, в основном, численные аномалии кариотипа. Методы дифференциальной окраски, дающие более полное представление о кариотипе благодаря идентификации не только всех хромосом набора, но и большинства структурных перестроек, подтвердили высокий уровень хромосомных и геномных мутаций у абортусов I и II триместров беременности [248]. Частоты и типы хромосомных аномалий, определенные разными группами исследователей, поразительно совпадают и свидетельствуют о специфике как в отношении типов хромосомных аномалий, так и хромосом, принимающих в них участие [93, 117].

Результаты кариотипирования абортусов, а также новорожденных с пороками развития позволяют не только оценить популяционные частоты различных хромосомных аномалий, но и составить прогноз их развития в зависимости от типа патологии [514].

подавляющее большинство исследований спонтанных выкидышей проведено на препаратах культивированных фибробластов кожи плода, в меньшей степени — на культурах клеток хориона и плаценты, в то время как суждение о кариотипе новорожденных основано исключительно на анализе ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови. Это означает, что фактически о хромосомном наборе целого организма в этих исследованиях судили по кариотипу клеток одной ткани. Между тем, анеуплоидия может затрагивать только часть клеток или быть ограниченной только одной тканью (см. главу 7). Если для спонтанных абортусов, мертворожденных или даже для новорожденных с пороками развития ошибочное заключение о кариотипе не столь существенно, то последствия диагностических ошибок при кариотипировании развивающегося плода могут быть весьма серьезными. В связи с этим, принципиально важным является вопрос о прогностической значимости для развивающегося плода его кариотипа, установленного по клеткам хориона/плаценты. Одним из подходов к оценке значимости хромосомного дисбаланса для прогноза развития плода, выявленного в цитотрофобласте, является сравнительный анализ частоты и спектра хромосомных aberrаций на разных стадиях развития.

В таблице 5.4 представлены обобщенные данные по частоте и спектру хромосомных aberrаций на разных стадиях развития человека.

Проведенный анализ доказывает неравнозначное участие разных хромосом в патологии внутриутробного развития человека. Как уже упоминалось, большинство численных хромосомных aberrаций, особенно *аутосомные моносомии*, несовместимы с нормальным внутриутробным развитием и приводят к гибели плода уже на ранних сроках беременности (до 10-й недели) [514]. Очевидно, именно поэтому нами обнаружен единственный случай полной формы моносомии 18 у плода 7–8-й недели развития.

5.3.1. Трисомия аутосом

На постимплантационных стадиях не зарегистрировано ни одного плода с трисомией хромосом 1 или 19. Предполагается, что трисомия

по этим хромосомам вообще не совместима с постимплантационным развитием [514]. Однако единичные случаи трисомии 1 обнаружены среди дробящихся зародышей, то есть их развитие возможно, по крайней мере, до стадии 10 бластомеров [650]. Один случай мозаичной трисомии 1 в клетках цитотрофобласта зарегистрирован и в наших исследованиях. По-видимому, на более поздних стадиях такие зародыши либо погибают, либо происходит элиминация бластомеров с дисбалансом этих хромосом.

Трисомия 2 (Тс2) описана лишь у спонтанных абортусов. При этом считается, что Тс2 характерна для клеток мезенхимной стромы ворсин хориона и выявляется лишь на препаратах культивированных клеток хориона [449]. Однако нами выявлен случай Тс2 в цитотрофобласте при развивающейся беременности (табл. 5.5), а в литературе описаны случаи пренатальной диагностики и живорождения детей с мозаичной формой Тс2 [264].

Тс3 — одна из наиболее частых трисомий, характерных для клеток цитотрофобласта (8 случаев в нашем исследовании), причем доля трисомных клеток может варьировать от единичных находок до полной формы [449].

По-видимому, трисомии хромосом группы В, как и большинства хромосом группы С, также летальны и достаточно редки даже в клетках хориона. В наших исследованиях зарегистрирован один случай полной формы трисомии 4, ограниченной цитотрофобластом.

Особого внимания заслуживают хромосомы 7, 8 и 9, для которых отмечена несколько повышенная, по сравнению с остальными хромосомами группы С, частота соответствующих трисомий в материале спонтанных абортусов. Случаи Тс7, Тс8 и Тс9, выявленные пренатально и у новорожденных, свидетельствуют о сублетальном эффекте избытка генетического материала этих хромосом. Следовательно, наличие даже мозаичной формы этих трисомий в клетках хориона требует исследования кариотипа плода. Известно, что Тс7 является одной из характерных для трофобласта трисомий (19 случаев в наших исследованиях). Между тем, мозаичные формы трисомии 7 описаны и в культурах клеток амниотической жидкости, а также в фибробластах кожи у детей после рождения [483]. Поэтому мнение, что Тс7 всегда ограничена цитотрофобластом [452], требует корректировки. Ограниченные плацентой полные формы трисомии по хромосомам группы С

Таблица 5.5. Частота (%) и спектр хромосомных аномалий на разных стадиях онтогенеза

Хромосома	Собственные данные (результаты пренатальной диагностики) N = 7579		Данные литературы [514]			
	Развива- ющаяся беремен- ность	Мозаи- цизм, огра- ниченный плацентой	Спонтан- ные абор- ты	Мертво- рожденные	Живорож- денные	Прогноз жизнеспособности
1	–	0,01	–	–	–	–
2	–	0,01	1,1	–	–	0
3	–	0,11	0,3	–	–	0
4	–	0,01	0,8	–	–	0
5	–	–	0,1	–	–	0
6	–	–	0,3	–	–	0
7	0,026	0,23	0,9	–	–	0
8	–	0,08	0,8	–	–	0
9	–	0,05	0,7	0,1	–	0
10	–	0,01	0,5	–	–	0
11	–	–	0,1	–	–	0
12	–	–	0,2	–	–	0
13	0,2	0,02	1,1	0,3	0,05	2,8
14	–	–	1,0	–	–	0
15	–	0,03	1,7	–	–	0
16	–	0,05	7,5	–	–	0
17	–	–	0,1	–	–	0
18	0,77	0,01	1,1	1,2	0,01	5,4
19	–	–	–	–	–	0
20	–	0,05	0,6	–	–	0
21	1,64	0,1	2,3	1,1	0,12	22,1
22	0,013	0,05	2,7	0,1	–	0
Мозаичные трисомии	0,05	–	1,1	0,5	0,02	9,0
Двойные трисомии	–	0,01	0,8	–	–	0
XXY	0,19	–	0,2	0,4	0,05	55,3
XXX	0,09	–	0,1	0,3	0,05	70,0
XYY	0,05	–	–	–	0,05	100,0
45,X	0,43	0,4	8,6	0,25	<0,01	0,3
Полипloidия	0,25	0,01	9,8	0,6	–	0
Структурные	0,12	0,01	2,0	0,4	0,6	62,0

(особенно 6, 7 и 11, в которых локализованы кластеры импринтированных генов), нуждаются в уточняющей диагностике кариотипа плода и исключении однородительской дисомии.

Из трисомий по хромосомам группы D (13, 14, 15) сублетальной является трисомия 13 (синдром Патау). Интересно отметить, что полные формы этой трисомии встречаются чаще, чем мозаичные, в т. ч. ограниченные плацентой. Летальные трисомии 14 и 15, выявленные в трофобласте, заслуживают внимания с точки зрения однородительской дисомии у плода. Поэтому при наличии в образце хориона клеток с трисомией любой из хромосом группы D необходимо кариотипирование плода по лимфоцитам пуповинной крови [896].

Tc16 является одной из наиболее частых численных аберраций на ранних стадиях развития (среди спонтанных абортусов ее частота составляет 7,5%). Интересно, что в нашей выборке был выявлен только один случай полной трисомии 16 и два случая с единичными трисомными клетками в цитотрофобласте плаценты. К сожалению, кариотип плода ни в одном случае исследовать не удалось. Однако описанные в литературе случаи Tc16 в клетках амниотической жидкости [742] позволяют предполагать, что, по крайней мере, мозаики с таким нарушением кариотипа могут развиваться до второго триместра беременности.

Случаи Tc17 не выявлены в наших исследованиях. В мозаичном варианте они описаны в амниоцитах II триместра [352], однако частота их невысока.

Tc18 (синдром Эдвардса) как сублетальная мутация встречается на всех стадиях внутриутробного развития. Как и другие частые сублетальные трисомии, Tc18 в основном представлена полными формами и гораздо реже — мозаичными. В нашем исследовании Tc18 была ограничена плацентой лишь в одном случае, тогда как другие авторы отмечают высокую частоту Tc18 в хорионе [740].

Tc20 долгое время считалась летальной на ранних эмбриональных стадиях. В настоящее время мозаичные случаи Tc20 выявлены пренатально в разные сроки беременности и у детей. Однако комплекс пороков при Tc20 в специфический синдром не выделен. Интересно, что обычно Tc20 ограничена клетками экстраэмбриональных тканей, а у плода она представлена только в клетках некоторых органов (почки, прямая кишка, пищевод) [364]. Все 4 случая полной и мозаичной Tc20 в нашем исследовании оказались ограничены клетками трофобласта.

Согласно многочисленным наблюдениям, для Тс21 (синдром Дауна) характерной является полная форма. В наших исследованиях мозаичная Тс21 с доминирующей диплоидной линией в цитотрофобласте установлена в 4 случаях. Ни в одном из них диагноз не был подтвержден при исследовании лимфоцитов пуповинной крови плода или периферической крови новорожденного. Однако мы полагаем, что все случаи мозаичной Тс21 в цитотрофобласте нуждаются в дополнительных исследованиях на других клетках (амниоциты, лимфоциты пуповинной крови), так как прогноз для жизнеспособности у плодов с трисомией 21, в отличие от других сублетальных трисомий, как правило, благоприятен (22,1 %) (табл. 5.4).

Известно, что Тс22 существует как самостоятельный синдром Тс22, т. е. является сублетальной [181]. Полная форма Тс22 зарегистрирована нами в цитотрофобласте лишь в одном случае; еще в трех она была представлена мозаичным вариантом.

5.3.2. Двойные трисомии

У спонтанных абортусов до 10-й недели беременности достаточно высока частота двойных и тройных трисомий по разным хромосомам [766]. В большинстве случаев двойные трисомии, независимо от хромосом, принимающих в них участие, являются летальными [514]. Этот факт подтверждают и наши находки при неразвивающейся беременности (табл. 5.2), а также единственный случай пренатальной диагностики 48,XXY,+21, зарегистрированный нами в хорионе у эмбриона с шейной гигромой (табл. 5.5).

Наиболее частыми являются ди- или трисомии половых хромосом. Именно эти случаи представляют наибольшую сложность для генетического консультирования — благоприятный антенатальный прогноз и совместимость с жизнью после рождения усугубляют проблему медико-генетических рекомендаций при выявлении у плодов анеуплоидии ХУУ, ХХУ, ХХХ. Следует напомнить, что кариотип 47,ХУУ не влияет на жизнеспособность плода, тогда как только 55,3 % плодов с кариотипом 47,ХХУ и 70 % с 47,ХХХ способны завершить внутриутробное развитие. При этом трипло-Х фактически не сказывается на развитии (среди спонтанных абортусов эта аномалия встречается редко — 0,1–0,2%), тогда как вероятность спонтанного прерывания беременности на более поздних стадиях, а также мертворождение заметно выше (табл. 5.5).

5.3.3. Моносомия

Единственная форма моносомии, совместимая с внутриутробным и постнатальным развитием — моносомия X. На ранних стадиях наличие единственной X-хромосомы зачастую приводит к гибели — среди спонтанных абортос частота плодов 45,X — самая высокая и достигает почти 10%. Мозаицизм X/XX представляет одну из самых серьезных проблем пренатальной диагностики. Высокая частота моносомии X в клетках цитотрофобласта диктует необходимость дополнительных исследований кариотипа амниоцитов или, что предпочтительнее, лимфоцитов пуповинной крови. Однако даже незначительная доля клеток с кариотипом 45,X в лимфоцитах плода не является гарантией рождения здоровой девочки. Подробнее мозаичные варианты моносомии X рассмотрены в главе 7.

5.3.4. Полиплоидия

Полиплоидия совместима с внутриутробным развитием у человека лишь в виде триплоидии 69,XXX и 69,XXY. Почти каждый 10-й спонтанный абортос является триплоидным [281]. При такой высокой смертности на ранних стадиях неожиданно высокой кажется частота триплоидии при прогрессирующей беременности (0,25%) (табл. 5.5). Из 14 случаев триплоидии в наших исследованиях 6 были установлены во II триместре беременности. Мозаичных вариантов $2n/3n$ нами не выявлено, однако они были зарегистрированы на разных стадиях внутриутробного развития другими исследователями [341]. Что касается *тетраплоидии*, то на прямых препаратах из образцов хориона, особенно в I триместре беременности, она встречается довольно регулярно, при этом частота тетраплоидных клеток цитотрофобласта может достигать 100%. Однако эта форма полиплоидии при развивающейся беременности ограничена исключительно плацентой.

Заключение

Многие типы хромосомных аномалий, такие как моносомии аутосом, гаплоидия, тетраплоидия встречаются только на доимплантационных стадиях развития; спектр численных хромосомных aberrаций на разных стадиях постимплантационного развития в целом соответствует таковому у мертворожденных или живорожденных; некоторые трисомии, считающиеся летальными (Tc2, Tc3), представлены пол-

ными формами только в экстраэмбриональных тканях, другие (Тс7, Тс20, Тс22) могут быть как ограничены плацентой, так и встречаться в отдельных тканях или органах плода; большинство сублетальных трисомий (Тс13, 18, 21) представлено в виде полных форм как в эмбриональных, так и в экстраэмбриональных тканях; совместимость с внутриутробным развитием и даже с живорождением многих типов трисомий, особенно их мозаичных форм, указывает на необходимость пересмотра существующей классификации летальных и сублетальных трисомий.

В этом разделе мы ограничились обсуждением геномных мутаций и не касались частичных трисомий и моносомий, обусловленных структурными перестройками хромосом и маркерными хромосомами. Специфика хромосомных мутаций требует специального рассмотрения, отметим только, что различные несбалансированные структурные aberrации, возникшие *de novo*, отмечены на всех этапах внутриутробного развития как у спонтанных абортусов, так и при прогрессирующей беременности.

ГЛАВА 6

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЧАСТОТУ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ

Введение

Причины возникновения геномных и хромосомных мутаций во время гаметогенеза и раннего эмбриогенеза подробно изучены в экспериментах на лабораторных млекопитающих. Показано, что хромосомные аномалии могут возникать под влиянием самых разнообразных химических (мутагены), физических (облучение, температурный шок) и биологических (вирусные инфекции) факторов. При этом повреждающие агенты могут быть экзогенными (большинство известных мутагенов), либо иметь эндогенную природу и быть следствием ошибок метаболизма, нарушений функций генов системы детоксикации токсических метаболитов (свободные радикалы, перекисные соединения и т. д.) или генов репарации ДНК, результатом стресса или нарушений гормонального гомеостаза. В последнем случае особенно важную роль в механизмах нерасхождения хромосом отводят процессам внутрифолликулярного и внефолликулярного созревания гамет, подробно исследованных в экспериментах на мышцах и золотистых хомячках [628]. Считается, что длительное (много лет и даже десятилетий) пребывание яйцеклеток в фолликулах на фоне постоянно меняющегося гормонального фона, а также достаточно долгая (несколько дней) миграция овулировавшей яйцеклетки к месту оплодотворения приводят к кристаллизации и дегенеративным изменениям актиновых нитей митотического веретена и, как следствие, к нарушению сегрегации мейотических и митотических хромосом. Ниже мы вернемся к более детальному рассмотрению других факторов и гипотез, объясняющих положительную корреляцию анеуплоидии с возрастом женщины (см. 6.1).

Сведения о факторах, приводящих к различным типам хромосомных аномалий, обобщены в многочисленных сборниках, монографиях и обзорах [5, 56, 31, 32, 293, 360, 552].

Прямые данные о влиянии различных факторов на возникновение хромосомных аномалий у человека весьма ограничены. Обычно о них судят путем экстраполяции на человека экспериментальных данных, либо по частотам так называемых «маркерных», или «сигнальных», фенотипов, таких как спонтанные аборт и некоторые хромосомные синдромы (болезнь Дауна, Эдвардса и др.) [28, 29, 30, 147]. Важная информация о влиянии радиации на гаметогенез и эмбриогенез человека была получена на основании обширных цитогенетических исследований ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС 1985 года, а также жителей пораженных областей Украины и Белоруссии и их потомства [77, 806]. В качестве других мутагенных факторов рассматривают курение, различные химические, в том числе и лекарственные, препараты (антифолиевые препараты, цитостатики). Среди факторов эндогенной природы в первую очередь выделяют аутоиммунный тиреоидит и диабет.

Из факторов, провоцирующих образование несбалансированных гамет и зигот у человека, к настоящему времени общепризнанными являются лишь возраст матери и гетерозиготное носительство хромосомных транслокаций. Однако, если вероятность образования несбалансированных гамет у носителя структурной перестройки хромосом безусловно, увеличена, то влияние других факторов на возникновение хромосомных аномалий не столь очевидно. Отчасти это связано с тем, что гетероплоидия, как правило, возникает *de novo*, что усложняет анализ причин ее происхождения. С другой стороны, не вызывает сомнения, что у некоторых супружеских пар частота хромосомных аберраций у потомства существенно выше популяционной, и они должны быть отнесены к группе высокого риска. Эти наблюдения послужили основой при разработке показаний для кариотипирования плода с целью профилактики хромосомных болезней (см. главу 9).

В данной главе рассмотрены причины возникновения хромосомных нарушений в гаметогенезе и эмбриогенезе человека, связанные с возрастом, наличием хромосомных перестроек, мозаичного анеуплоидного набора хромосом у одного из родителей, а также влияние на сегрегацию хромосом некоторых других генетических факторов, природа которых еще недостаточно изучена.

6.1. Возраст

Возраст матери — один из немногих твердо установленных факторов, влияющих на частоту анеуплоидии у потомства. Постулат об экспоненциальной зависимости частоты Тс21 от возраста матери, выдвинутый известным английским генетиком Penrose еще в 1933 году, нашел свое подтверждение в многочисленных исследованиях [187]. Для Тс16, Тс13 и Тс18 показана линейная зависимость частоты анеуплоидии от возраста матери [449, 514]. Следует, однако, отметить, что для анеуплоидии по другим ауто索мам, а также триплоидии, зависимости от возраста матери не установлено. Все вышесказанное наглядно иллюстрируют результаты пренатальной диагностики хромосомных болезней в Санкт-Петербурге (рис. 6.1)*.

Известно, что анеуплоидия является, главным образом, следствием аномальной сегрегации хромосом в оогенезе. При этом основное число анеуплоидов возникает в результате нерасхождения хромосом в 1-м делении мейоза (см. главу 3). В чем смысл и каковы биологические механизмы «старения яйцеклетки» с возрастом женщины остается мало понятным. Для объяснения этого феномена было выдвинуто несколько гипотез. Рассмотрим некоторые из них.

Гипотеза «ограниченного пула» [708] основана на предположении о том, что по мере старения организма истощается пул ооцитов, и в каждом цикле уменьшается среднее число антральных фолликулов (см. главу 1). При этом хромосомы в «перезрелых» ооцитах возрастных женщин более подвержены нерасхождению. Эти процессы не связаны напрямую с хронологическим возрастом женщины, хотя во многом свойственны именно стареющему организму. Косвенно эту гипотезу подтверждают экспериментальные данные и некоторые клинические наблюдения [395, 396]. Так, отмечено повышение уровня анеуплоидных ооцитов у мышей с одним удаленным яичником, а также рождение детей с анеуплоидным кариотипом пациентками с синдромом Тернера, имеющими частичную дисгенезию гонад [449].

Не утратила своего значения сегодня и *гипотеза «продуктивной линии»* [465]. Она основана на предположении, что в эмбриональном яичнике млекопитающих существует определенный порядок вступления оогониев в мейоз: первичные половые клетки, первыми достигшие зачатков гонад, первыми вступают в мейоз и впоследствии первыми

* Рисунок на цв. вкл.

овулируют. Для них характерна высокая частота хромосомных рекомбинаций (хиазм) в отличие от оогониев, которые позже вступили в мейоз. Вследствие различий в частоте хиазообразования ранние ооциты характеризуются низким числом унивалентов и, соответственно, низкой частотой нерасхождения хромосом в первом делении мейоза, тогда как ооциты, овулирующие позже, имеют повышенную частоту унивалентов и, соответственно, более высокую частоту анеуплоидии. Каковы механизмы, регулирующие последовательность вступления ооцитов в мейоз и определяющие порядок их овуляции, остается совершенно неясным. Более того, нет прямых экспериментальных доказательств четкой корреляции между анеуплоидией и числом унивалентов в ооцитах [11]. Наконец, нельзя не обратить внимание, что эта гипотеза, возможно являясь справедливой для мышевидных грызунов, пока не получила прямых доказательств для человека [395].

Другие предположения о происхождении анеуплоидии в оогенезе человека касаются неблагоприятных «местных» факторов [395]. К таковым, например, можно отнести половые гормоны. Предполагается, что возрастные гормональные изменения могут ускорять процесс мейотического созревания ооцитов и быть причиной аномальной сегрегации хромосом. Не исключено также, что с возрастом женщины нарушается образование веретена деления или изменяется продолжительность клеточного цикла. Получены прямые экспериментальные доказательства корреляции между кислотностью фолликулярной жидкости, способностью к образованию митотического веретена и анеуплоидией. Все эти предположения основаны на сравнительном анализе процессов созревания *in vitro* ооцитов мышей разного возраста. В какой мере эти факторы справедливы для человека пока неизвестно.

Вопрос о том, какая из предложенных гипотез соответствует действительности и в какой мере они определяются индивидуальными особенностями, требует дальнейшего изучения. Следует учитывать при этом что решающая роль в нерасхождении хромосом как в первом так и во втором делениях мейоза отводится процессам рекомбинации хромосом, то есть частоте и локализации хиазм (см. главу 4).

Повышенный риск рождения детей с хромосомными болезнями отмечается не только у женщин старшего репродуктивного возраста, но, что достаточно неожиданно, и у женщин в возрасте до 20 лет [31, 182, 187, 457]. Увеличение частоты плодов с геномными мутациями, в т. ч.

с Тс21, у юных матерей зарегистрировано и в наших исследованиях (рис. 6.1)*. Можно предполагать, что повышенная частота нерасхождения хромосом в раннем репродуктивном возрасте обусловлена более резкими колебаниями содержания половых гормонов на разных фазах менструального цикла.

Информация о влиянии возраста отца на возникновение генетических мутаций противоречива. Так, установлено зависимое от возраста увеличение частоты сперматозоидов со структурными aberrациями, а также с дисомиями 1, YY, XX и XY [449, 451]. При этом риск иметь сына с синдромом Клайнфельтера (кариотип 47,XXY) у 50-летних мужчин вдвое выше, чем у 20-летних (0,19 и 0,08 % соответственно) [449]. Однако влияние возраста на нерасхождение хромосом в сперматогенезе, если оно и существует, менее выражено, чем в оогенезе. Интересно, что постзиготическое нерасхождение отцовских хромосом 15, 18 и 21 (т. е. нерасхождение хромосом из мужского пронуклеуса в первых делениях дробления зиготы) регистрируется чаще в случаях оплодотворения сперматозоидами от пожилых мужчин [753]. Этот феномен требует дальнейшего изучения. Также не выявлено значимого влияния на образование гетероплоидных сперматозоидов таких факторов как химиотерапия, табакокурение, ионизирующее и электромагнитное излучение [671, 794]. По-видимому, у мужчин, в отличие от женщин, имеет место более строгая пре-зиготическая селекция гамет [56].

В заключение следует подчеркнуть, что далеко не все хромосомы равновероятно участвуют в анеуплоидии, обусловленной возрастными факторами (рис. 6.1)*. Сопоставление многочисленных данных свидетельствует о том, что возраст родителей не влияет на частоту триплоидии, моносомии X, трисомий по хромосомам групп А и В, тогда как трисомии 21, 13, 16, 18 и трипло-X действительно, чаще отмечаются в потомстве женщин старшего репродуктивного возраста [395, 514]. Приведенные результаты являются еще одним доказательством того, что с возрастом матери увеличивается частота трисомии 21, обусловленная нерасхождением хромосом в первом делении мейоза. Учитывая данные, полученные при исследовании доимплантационных зародышей,

* Рисунок на цв. вкл.

а также при анализе ооцитов, заблокированных на стадии метафазы II (см. главу 5), можно утверждать, что механизмы, определяющие возрастзависимую анеуплоидию, различны. Интересно также отметить, что прямую корреляцию с возрастом обнаруживают только полные формы анеуплоидии, тогда как мозаицизм хромосом, очевидно, не имеет возрастзависимой тенденции. Это утверждение справедливо и для хромосомного мозаицизма, ограниченного клетками плаценты — его частота в группе возрастных женщин, по нашим данным, составляет 1,9%, что соответствует средней частоте плацентарного мозаицизма [529].

Таким образом, не вызывает сомнения, что образование анеуплоидных гамет зависит от возраста и пола, однако механизмы этих феноменов, несмотря на наличие многих гипотез, остаются до конца невыясненными. Соответственно, неясны и возможные пути предупреждения образования хромосомных аномалий в процессе гаметогенеза. Единственным реальным способом профилактики хромосомных болезней у потомства в настоящее время остается пренатальная, в т. ч. доимплантационная, диагностика (см. главу 9).

6.2. Гетерозиготное носительство структурных перестроек хромосом

Частота носителей сбалансированных структурных перестроек хромосом значительна и составляет примерно 1 : 400 в общей популяции [749] или 1 : 500 новорожденных [694]. Исключением является инверсия прицентромерного гетерохроматинового района хромосомы 9 (популяционная частота около 1–3%), которая в настоящее время считается вариантом нормального кариотипа [510]. Частота супружеских пар, в которых один из партнеров является носителем сбалансированной хромосомной перестройки, составляет примерно 1/100–200 [267]. Такие супружеские пары имеют повышенный риск зачатия ребенка с несбалансированным кариотипом вследствие образования гамет с частичной трисомией или моносомией. Результатом такого зачатия могут быть бесплодие, обусловленное гибелью зиготы до имплантации, самопроизвольные выкидыши на разных стадиях внутриутробного развития или рождение ребенка с множественными пороками.

Кратко рассмотрим особенности поведения различных хромосомных перестроек в гаметогенезе.

6.2.1. Реципрокные транслокации

Как известно, не менее половины сбалансированных аутосомных перестроек в популяции представлено реципрокными транслокациями [267].

Частота гетерозигот по реципрокным транслокациям оценивается как 1 на 600 супружеских пар [305]. Реальный риск рождения жизнеспособных детей с несбалансированным кариотипом определяется характером реципрокной транслокации (спецификой хромосом, вовлеченных в перестройку, размерами транслоцированных сегментов) и может достигать 40 % [578].

Процессы конъюгации, рекомбинации и сегрегации транслоцированных хромосом в мейозе подробно рассмотрены в соответствующей литературе [56, 177, 187]. Кратко характеризуя особенности поведения aberrантных хромосом отметим, что при гетерозиготном носительстве реципрокных транслокаций в профазе мейоза они образуют не бивалент, а комплекс из четырех хромосом (квадривалент). В зависимости от характера их сегрегации в анафазе возможно образование нескольких типов гамет, только одна из которых будет иметь нормальный и одна — сбалансированный набор хромосом, в то время как остальные гаметы будут иметь частичные трисомии или моносомии, т. е. будут несбалансированными (рис. 6.2). Пренебрегая редкими случаями сегрегации хромосом по типу смежного-2 и 3 : 1, а также еще более усложняющими ситуацию обментами между различными участками нормальных и транслоцированных хромосом, следует ожидать, что 25 % гамет окажутся нормальными, 25 % — сбалансированными и 50 % — несбалансированными.

Эти теоретически ожидаемые пропорции подтверждаются экспериментальными данными, полученными при непосредственном исследовании хромосомного набора в зрелых гаметах. Так, суммарная частота нормальных и сбалансированных сперматозоидов у мужчин-носителей различных реципрокных транслокаций составляет в среднем около 46 %, несбалансированных — 54 % [451]. Однако преобладание какого-либо определенного типа сегрегации хромосом в сперматогенезе у гетерозигот по различным транслокациям с учетом особенностей хиазмообразования вряд ли можно считать установленным [240]. Детальные исследования поведения реципрокных транслокаций в оогенезе отсутствуют, однако согласно данным литературы, частота несбалансированных кариотипов

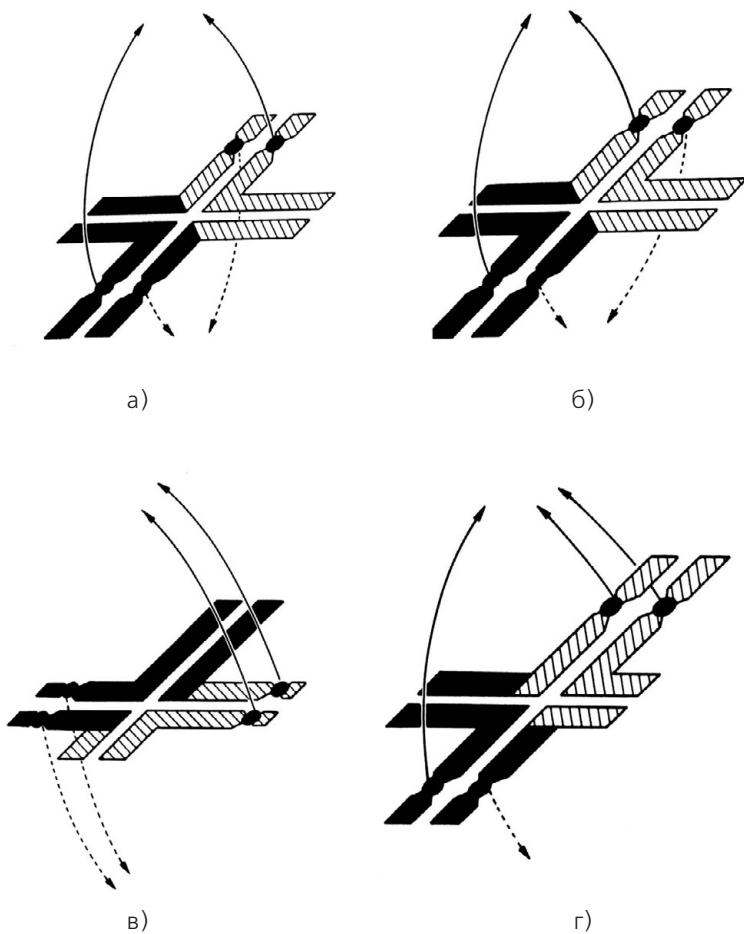


Рис. 6.2. Схема транслокационного квадриллента и варианты сегрегации хромосом в анафазе I мейотического деления. При альтернативном расхождении (а) образуются нормальная и сбалансированная гаметы. Совместное (смежное) расхождение (б, в), при котором образуются 4 несбалансированные (с частичными трисомиями и моносомиями) гаметы. При смежном-1 типе сегрегации (б) в гамету попадают хромосомы с неомологичными центромерами — одна нормальная и одна aberrантная. При смежном-2 типе (в) в гамету попадают хромосомы с идентичными центромерами — нормальная и aberrантная. При сегрегации 3:1 (г) в одну из гамет попадают 3 хромосомы, в другую — только одна, при этом распределение хромосом из квадриллента может происходить равновероятным образом [187]

у плодов при развивающейся беременности и у новорожденных примерно одинакова как при материнском, так и при отцовском носительстве реципрокных транслокаций [267, 347, 578].

Следует отметить, что многочисленные данные по пренатальному и постнатальному кариотипированию потомков носителей реципрокных транслокаций свидетельствуют о несоответствии между частотой несбалансированных гамет и частотой несбалансированных зигот, причем число потомков с несбалансированным кариотипом оказывается намного меньше ожидаемого. К такому снижению может приводить несколько причин. Так, определенный вклад могут вносить дополнительные аномалии поведения хромосом в мейозе, проявляющиеся по-разному в зависимости от размера транслоцированного участка и хромосом, затронутых перестройкой. Нельзя исключить влияние избирательной селекции, направленной против гамет с несбалансированным хромосомным набором, а также предпочтительного участия в оплодотворении нормальных и/или сбалансированных гамет. Наконец, эта селекция, осуществляющаяся на уровне зигот, приводит к их гибели на разных стадиях эмбрионального развития, включая доимплантационный период. При обследовании супружеских пар с бесплодием или привычным невынашиванием установлено, что хромосомные перестройки у отца встречаются почти вдвое чаще, чем у матери [267, 347, 578], что еще раз подтверждает влияние хромосомных aberrаций на процесс сперматогенеза, которое приводит как к снижению спермопродукции, так и, возможно, к образованию функционально неполноценных гамет с хромосомным дисбалансом.

В наших исследованиях было выявлено лишь 9 случаев несбалансированных кариотипов, обусловленных родительскими aberrациями (рис. 6.3). Остальные плоды имели нормальный или сбалансированный кариотипы (табл. 6.1). При этом не было отмечено хромосомных aberrаций других хромосом, не вовлеченных в перестройку. Между тем, пренатально зарегистрированы единичные случаи трисомий 21 и 13 у родителей-носителей реципрокных транслокаций между аутосомами [347]. Отсутствие данных о родительском происхождении добавочных хромосом в этих исследованиях не позволяет полностью исключить комплементацию гамет, или, иными словами, случайного совпадения. Поэтому вопрос о существовании межхромосомного влияния реципрокных транслокаций на сегрегацию других хромосом в мейозе у человека, эк-

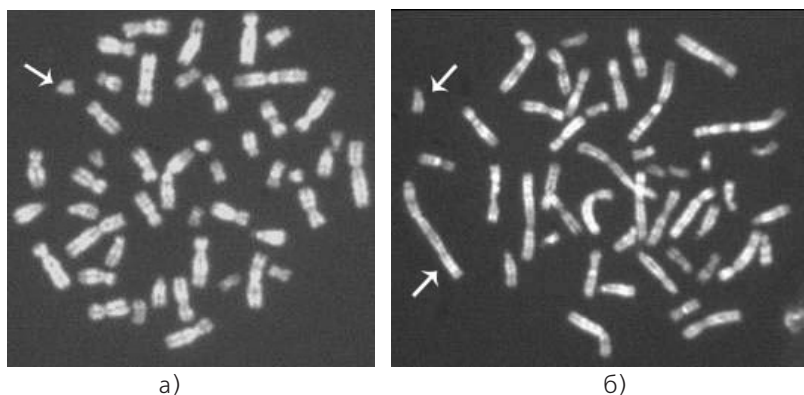


Рис. 6.3. Случай несбалансированного кариотипа у плода при сегрегации хромосом 3:1 в мейозе у матери-носительницы реципрокной транслокации: а — кариотип плода 47,XX,+der(13); б — кариотип матери 46,XX,t(3;13)(q21;q12). Метафазные пластинки из ФГА-стимулированных лимфоцитов. Окраска QFH/AcD

Таблица 6.1. Результаты пренатальной диагностики в группе носителей структурных aberrаций хромосом

Тип aberrации	Носитель	Число случаев	Кариотип плода		
			нормальный	сбалансированный	несбалансированный
Реципрокные транслокации (n = 46)	Мать	30	5	17	8
	Отец	12	4	7	1
	Неизвестно	4	1	1	2
Робертсоновские транслокации (n = 40)	Мать	25	5	18	2
	Отец	9	2	6	1
	Неизвестно	6	0	3	3
Инверсии (n = 8)	Мать	4	3	1	0
	Отец	4	2	2	0
Инверсии 9ph (n = 130)	Мать	34	8	26	0
	Отец	29	9	18	2
	Оба родителя	1	0	1	0
	Неизвестно	66	5	58	3
Всего		224	44	158	22

спериментально подтвержденный на мышах [11], остается открытым.

Таким образом, генетически несбалансированные гаметы, как сперматозоиды, так и ооциты, возникают чаще, чем они регистрируются при пренатальной диагностике и у потомков носителей транслокаций [266]. Наиболее вероятным кажется предположение, что эти различия обусловлены не столько селекцией несбалансированных гамет в мейозе и на постмейотических стадиях сперматогенеза или неспособностью яйцеклетки к оплодотворению, сколько летальным эффектом большинства из несбалансированных хромосомных наборов на ранних стадиях эмбриогенеза.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что соотношение сбалансированных и несбалансированных гамет варьирует в зависимости от хромосом, затронутых перестройкой, а также от локализации точек разрыва. Однако во всех случаях их реальное соотношение существенно отличается от теоретически ожидаемого.

6.2.2. Робертсоновские транслокации

Робертсоновские транслокации, или центрические слияния акроцентрических хромосом, являются одним из наиболее распространенных типов хромосомных аномалий у человека. По некоторым данным, их частота составляет 1:1000 новорожденных [796]. Их носители фенотипически нормальны, однако риск самопроизвольных выкидышей и рождения детей с несбалансированным кариотипом существенно варьирует в зависимости от хромосом, вовлеченных в слияние, а также от пола носителя.

В мейозе транслоцированная хромосома и ее два нормальных гомолога формируют тривалент [56, 177, 187]. В зависимости от типа сегрегации образуются 2 варианта генетически сбалансированных гамет (одна с перестройкой и одна с нормальным набором хромосом) и 4 варианта несбалансированных гамет (рис. 6.4). Несбалансированные гаметы в случае оплодотворения приводят либо к моносомии, летальной уже на ранних стадиях, либо к трисомии, фенотипические проявления которой зависят от природы лишней хромосомы.

Анализ частот различных типов сегрегации проводится, как правило, на основе изучения хромосомного набора у потомства до или после рождения. Так, при анализе доимплантационных зародышей установлено, что преобладающей и в оогенезе и в сперматогенезе (70 и

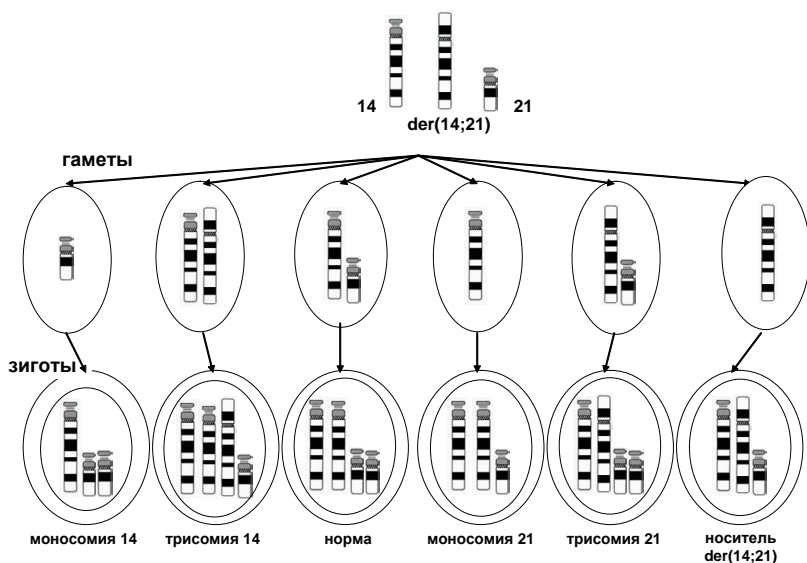


Рис. 6.4. Схема образования гамет у носителя сбалансированной Робертсоновской транслокации между негомологичными хромосомами и варианты зигот после оплодотворения нормальными гаметями

90% соответственно) является альтернативная (чередующаяся) сегрегация, приводящая к нормальным и сбалансированным гаметам. При этом зиготы с хромосомным дисбалансом образуются, как правило, в результате смежной-1 сегрегации, которая происходит в три раза чаще в оогенезе, чем в сперматогенезе.

Очевидно, более точная информация может быть получена при непосредственном анализе гамет у носителей Робертсоновских транслокаций. Установлено, что в профазе мужского мейоза Робертсоновские транслокации преимущественно формируют тривалент в *cis*-конфигурации [615, 618], которая способствует чередующемуся (альтернативному) типу сегрегации и доминирует независимо от хромосом, вовлеченных в центрическое слияние (72,2–96,7% случаев) [56, 451].

Методом гетерологичного оплодотворения яйцеклеток хомячка сперматозоидами от 6 носителей Робертсоновских транслокаций установлено, что отношение несбалансированных наборов хромосом к сбалансированным и нормальным соответствует распределению 3:1 [451].

Собственные исследования анализа хромосомного набора сперматозоидов от пациента с Робертсоновской транслокацией 45,XY,der(13;14) позволяют также отметить преобладание чередующегося типа сегрегации хромосом, при этом частота несбалансированных сперматозоидов составила 8,77%, а частота сбалансированных сперматозоидов почти в 2 раза превышала частоту сперматозоидов с нормальным кариотипом (40,35 и 26,31% соответственно) [185]. Аналогичные выводы были сделаны и другими авторами при анализе сперматозоидов от пациента с центрическим слиянием хромосом der(13;14) [685] и анализа кариотипов новорожденных от отцов с Робертсоновскими транслокациями [266]. Тем не менее, механизмы презиготического отбора гамет в пользу сбалансированных сперматозоидов, несущих der(13;14), остаются неясными.

Важной особенностью поведения Робертсоновских транслокаций в сперматогенезе является ассоциация тривалента с половым бивалентом XY, которая часто наблюдается на стадии пахитены у носителей der(13;14), а также у носителей других Робертсоновских транслокаций, в которые вовлечены акроцентрические хромосомы группы G [796]. При этом следует отметить, что нередко такая устойчивая ассоциация приводит к блоку мейоза на стадии пахитены и сопровождается выраженными нарушениями сперматогенеза [56].

Как и при реципрокных транслокациях, частота возникновения несбалансированных гамет оказывается существенно выше частоты несбалансированных кариотипов у потомков (ранних эмбрионов, плодов или новорожденных) [266, 347].

В нашем исследовании при кариотипировании плодов, у которых один их родителей был носителем Робертсоновской транслокации, в 70% установлен сбалансированный, в 7 случаях — нормальный и в 6 — несбалансированный кариотип (табл. 6.1).

Интерес представляет сравнительный анализ роли различных Робертсоновских транслокаций в возникновении анеуплоидии у потомства. Как известно, большинство Робертсоновских транслокаций у человека (74%) затрагивают хромосомы 13 и 14 [796]. В структуре обращаемости на пренатальную диагностику лидерами оказываются носители der(13;14) и der(14;21) [267]. Из супружеских пар с Робертсоновскими транслокациями, по нашим данным, они составили 12 и 9 соответственно (табл. 6.2).

Таблица 6.2. Результаты пренатальной диагностики в семьях носителей Робертсоновских транслокаций

Тип транслокации	Носитель	Собственные результаты				По [266]	
		Кариотип плода				Кариотип плода	
		Число случаев	Нормальный	Сбалансированный	Несбалансированный	Число случаев	Несбалансированный
13q13q	Неизвестно	1	0	0	1	–	–
13q14q	Мать	8	0	8	0	157	0
	Отец	4	0	4	0	73	0
	Неизвестно	3	0	3	0	–	–
13q15q	Мать	1	1	0	0	–	–
13q21q	Мать	1	0	1	0	20	2
	Отец	–	–	–	–	11	0
13q22q	Мать	1	1	0	0	–	–
	Отец	2	0	1	1	–	–
14q21q	Мать	7	2	3	2	137	21
	Отец	2	2	0	0	51	0
	Неизвестно	2	1	0	1	–	–
14q22q	Мать	2	0	2	0	–	–
	Отец	1	1	0	0	–	–
15q21q	Мать	2	1	1	0	9	1
	Отец	–	–	–	–	5	0
15q22q	Мать	–	–	–	–	–	–
	Отец	1	0	1	0	–	–
21q21q	Неизвестно	1	0	0	1	–	–
21q22q	Мать	1	1	0	0	19	3
	Отец	–	–	–	–	30	0
Всего		40	10	24	6	512	27

Любопытно, что $der(13;14)$ наследуется независимо от родительского происхождения и обнаруживается только в сбалансированном кариотипе (табл. 6.2). В то же время, наследование $t(14;21)$ от матери нередко сопровождается трисомией 21, тогда как при отцовском носительстве $t(14;21)$ случаи несбалансированного кариотипа у потомства не зарегистрированы (табл. 6.2). Полученные данные хорошо соответствуют обобщенным результатам других исследований [267, 347].

Обращает на себя внимание явное преобладание в потомстве носителей плодов с Робертсоновскими транслокациями над плодами с нормальным кариотипом (табл. 6.2). При этом наследование продуктов центрического слияния происходит чаще, когда носительницей перестройки является мать [347]. Является ли это случайным или отражает какие-то имманентные особенности сегрегации транслоцированных хромосом в женском мейозе, как ранее было показано в экспериментах на лабораторных мышах-носителях Робертсоновских транслокаций [54], остается неизвестным и заслуживает дальнейшего изучения.

На основе общей частоты несбалансированных гамет, специфичности хромосом, вовлеченных в центрические слияния, можно рассчитать риск рождения жизнеспособных детей с несбалансированным кариотипом. Поскольку у мужчин-носителей транслокаций 13;14, 14;21, 21;22 дисомия по хромосомам 13 и 21 составляет примерно 1/3 от всех несбалансированных сперматозоидов (максимальная частота 26,5%), теоретический риск рождения ребенка с трисомией 13 или 21 составляет 0–10% [451]. Если транслокация 14;21 присутствует у матери, то вероятность рождения ребенка с трисомией 21 возрастает и оценивается в 10–15% [267].

В случае центрического слияния гомологичных хромосом прогнозы намного более мрачные. Теоретически Робертсоновские транслокации возможны для всех 5 акроцентрических аутосом групп D и G. Однако более распространенными являются транслокации 21;21 и реже 13;13 и 22;22. Риск рождения детей с трисомией 21, 13 и 22 при соответствующих транслокациях будет оцениваться в 100%. Такая ситуация объясняется образованием только двух типов гамет: 1) несущих транслокацию и, следовательно, дисомных по аберрантным хромосомам; 2) нуллисомных по этим хромосомам (рис. 6.5). Образующиеся в результате оплодотворения таких гамет зиготы с моносомией по любой из

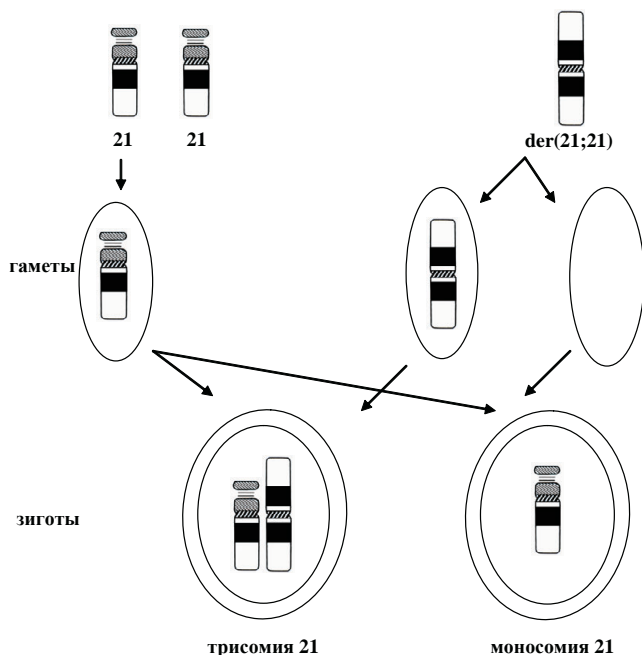


Рис. 6.5. Схема образования гамет у носителя Робертсоновской транслокации между гомологичными хромосомами (или изохромосомами по длинным плечам акроцентрических хромосом групп D и G) и варианты зигот после оплодотворения нормальными гаметами

хромосом групп D и G, а также с трисомией 14 и 15 при транслокациях 14;14 и 15;15 оказываются нежизнеспособны [125, 187].

Одной из возможных причин несоответствия теоретически ожидаемого и реального числа анеуплоидии в потомстве гетерозигот по Робертсоновским транслокациям может быть *однородительская дисомия (ОРД)* — присутствие в кариотипе плода двух продуктов мейоза одной хромосомы от одного из родителей и отсутствие нормального гомолога от другого (см. раздел 3.2.5). В настоящее время ОРД рассматривается в качестве одного из важных факторов патологии постнатального развития, связанной с дисбалансом импринтированных генов — болезни импринтинга [121]. Постзиготическая коррекция числа хромосом путем элиминации непарного гомолога на ранних стадиях дробления представляется весьма вероятным механизмом ОРД у таких эмбрионов. Поэтому наличие

Робертсоновской транслокации в кариотипе плода особенно в сочетании с мозаицизмом хромосом в плаценте следует рассматривать как важный аргумент в пользу необходимости исключения ОРД у плода (см. главу 9).

Таким образом, вероятность несбалансированного кариотипа у плода/ребенка у носителей Робертсоновских транслокаций ниже теоретически ожидаемой и определяется спецификой хромосом, вовлеченных в центрическое слияние. Робертсоновские транслокации не вызывают других аномалий кариотипа и, как правило, не приводят к дисбалансу хромосом, не вовлеченных в центрическое слияние. Наличие Робертсоновской транслокации у плода в сочетании с ограниченным плацентой мозаицизмом хромосом указывает на возможность однородительской дисомии, которая может явиться причиной серьезных нарушений на постнатальных стадиях развития.

6.2.3. Инверсии

Парацентрические инверсии, не изменяющие морфологию хромосомы, представляют собой тип структурных aberrаций, которые, как правило, не поддаются идентификации стандартными цитогенетическими методами. Носители парацентрических инверсий регистрируются только при наличии несбалансированных форм у новорожденных с пороками развития. Поскольку хромосомные перестройки, приводящие к дисбалансу генетического материала, как правило, летальны на самых ранних стадиях эмбриогенеза, частота их носителей в популяции оценивается как крайне низкая [589].

Перицентрические инверсии, сопровождающиеся морфологическими изменениями хромосом, представлены в популяции человека достаточно широко и исследованы более детально. Перицентрические инверсии, особенно крупных хромосом, драматически влияют на фертильность (12% носителей инверсий бесплодны), тогда как фертильность у гетерозигот по парацентрическим инверсиям, как правило, не нарушена [451].

Причиной таких различий являются особенности поведения aberrантных хромосом в гаметогенезе. Известно, что конъюгация хромосом в профазе мейоза при наличии инверсий происходит с образованием петли (рис. 6.6). Предполагается, что локализация точек разрыва в R-сегментах не препятствует образованию инверсионной петли и рекомбинации, в то время как их локализация в G-сегментах или сочетание разрывов в G⁺- и G⁻-блоках затрудняют гомологичную

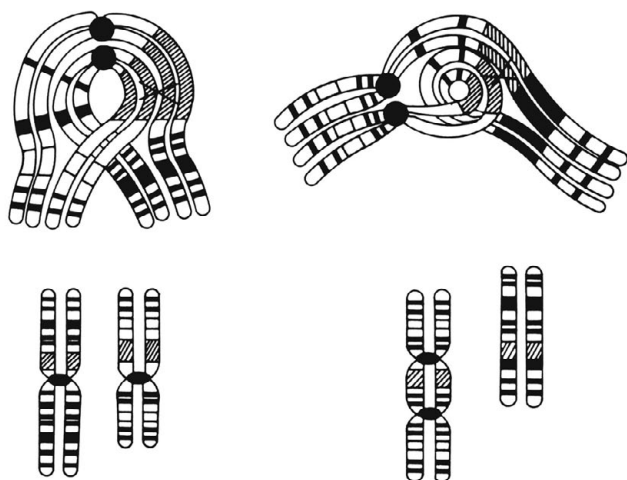


Рис. 6.6. Нарушение конъюгации хромосом у гетерозиготы по перичесентрической (слева) и парацентрической (справа) инверсии. Кроссинговер в инверсионной петле (отмечен крестом) приводит к образованию aberrантных хромосом [187]

рекомбинацию и могут приводить к гетеросинапсису [241]. Исследования синаптонемного комплекса [437] и хромосомного набора сперматозоидов [451] у мужчин-носителей инверсий показали, что характер рекомбинации зависит не только от локализации точек разрыва, но и от размеров инверсионной петли. Так, инверсия протяженностью менее 30% хромосомы приводит к полному подавлению рекомбинации между гомологичными хромосомами. В случаях, когда инвертированный участок занимает более 50% длины хромосомы, рекомбинация происходит с частотой 11–30%. Если у носителей протяженной инверсии зарегистрирована высокая (25–30%) частота несбалансированных сперматозоидов, то у гетерозигот по короткому инвертированному сегменту несбалансированных сперматозоидов вообще не обнаружено [784]. Показано также, что у мужчин с нормальной репродуктивной функцией соотношение сперматозоидов с инвертированной и нормальной хромосомой фактически не отличается от 1:1 [451]. Эти результаты принципиально важны для пренатальной диагностики при наличии инверсии в кариотипе родителей.

По нашим данным, в 8 семьях с инверсиями аутосом 2 (2 семьи), 7, 10 (3 семьи), 12 и 16 (табл. 6.1) в 5 случаях кариотип у плода оказался нормальным и в 3 — сбалансированным с унаследованной инверсией. Интересно отметить, что, при относительной редкости пренатально выявленных несбалансированных кариотипов у носителей инверсий (1,7%) [347], у новорожденных с множественными пороками развития их частота оказывается более высокой [267].

Что касается инверсий гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16, то вопрос о том, являются ли они действительно структурными перестройками, или же их следует рассматривать как варианты нормального полиморфизма, решен в пользу последнего. Согласно Международной номенклатуре хромосом [510] вместо традиционной аббревиатуры *inv* эти варианты хромосом предложено обозначать как 1ph, 9ph и 16ph. Следует отметить, что еще до этого предложения особенности локализации прицентромерного гетерохроматинового района на коротких плечах хромосом 1, 9 и 16, равно как и хромосомы 19, рассматривались как полиморфные [64] или «физиологические» [158] варианты нормального кариотипа. Многие исследователи придерживаются мнения о структурной и функциональной нейтральности инверсий прицентромерных гетерохроматиновых районов [117]. Между тем, данные некоторых авторов [2] не позволяют полностью исключить негативную роль 9ph в сегрегации мейотических хромосом и ее связь с привычным невынашиванием. В связи с отсутствием единой точки зрения о роли этих хромосомных вариантов в формировании анеуплоидных гамет, и, следовательно, о целесообразности пренатальной диагностики при их наличии, уместно уделить этому вопросу особое внимание.

Известно, что наиболее часто в популяции (1–3%) представлен полиморфизм прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9 — варианты 9ph и реже 9phqh. Среди носителей варианта 9ph женщины встречаются в 1,7 раза чаще, чем мужчины [900].

Согласно нашим данным, такой полиморфизм был зарегистрирован у 130 плодов. В 34 случаях носителем 9ph являлась мать, в 29 — отец, в одном случае — оба родителя и в 66 родительская принадлежность осталась неизвестной (табл. 6.1). При пренатальном кариотипировании установлено преимущественное наследование хромосомы с инверсией гетерохроматинового района независимо от родительско-

го происхождения (45 случаев из 63). В случае, когда носителями являлись оба родителя, плод унаследовал вариант 9ph от матери и нормальный гомолог хромосомы 9 от отца. Несбалансированный кариотип (Tc18 — 2 случая, Tc22, 47,XXX и 47,XXY) был установлен у 5 плодов (табл. 6.1), причем хромосомный дисбаланс во всех случаях сочетался с наличием 9ph. Таким образом, частота плодов с несбалансированным кариотипом в группе носителей 9ph оказалась достаточно высокой — 5 из 130 (3,8%), что пятикратно превышает частоту геномных мутаций в группе низкого риска хромосомных болезней у плода (0,75%).

Аналогичная ситуация наблюдается и при анализе анамнестических данных — частота детей с хромосомными болезнями у родителей-носителей 9ph оказалась в 5 раз выше, чем в популяции (табл. 6.3). Частота спонтанных аборт и рождение детей с множественными пороками развития у носителей 9ph Санкт-Петербурга были сопоставимы с таковыми у гетерозигот по реципрокным и Робертсоновским транслокациям (табл. 6.3). Таким образом, наши данные свидетельствуют против нейтральности инверсии прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9. Они, скорее, показывают, что вариант 9ph может влиять на нерасхождение хромосом, а также увеличивать вероятность спонтанного прерывания беременности и рождения детей с множественными пороками развития. Эти выводы хорошо согласуются с результатами крупномасштабных популяционных исследований в Японии [900]. Патогенетические механизмы этого явления остаются неизвестными. Предположение о межхромосомном эффекте, т. е. о влиянии 9ph на поведение других хромосом в мейозе и митозе, отчасти подтверждается при исследовании

Таблица 6.3. Частота хромосомного дисбаланса и акушерской патологии у пациенток-носителей структурных aberrаций хромосом (согласно анамнестическим данным)

Хромосомная aberrация	Всего в группе	Спонтанные аборты	Ребенок с хромосомной болезнью	Ребенок с множественными пороками развития
Реципрокные транслокации	46	16 (37,78 %)	2 (4,34 %)	6 (13,04 %)
Робертсоновские транслокации	40	9 (22,5 %)	11 (27,5 %)	3 (7,5 %)
9ph	131	17 (22,27 %)	6 (4,58 %)	13 (9,92 %)

хромосомного комплекта в сперматозоидах методом FISH [505] и метафазных пластинок при стандартном кариотипировании по ФГА-стимулированным лимфоцитам периферической крови [656]. Следует подчеркнуть, однако, что статистические данные, касающиеся эффекта 9ph, обычно ограничены сопоставлением частот встречаемости той или иной патологии в группе носителей и в норме (в популяции). Эти исследования, как правило, не подкреплены изучением происхождения анеуплоидии, что принципиально важно для понимания эффекта изучаемой хромосомной aberrации. Ни в одном из описанных в литературе случаев негативного влияния 9ph, как и в наших исследованиях, родительское происхождение дополнительной хромосомы не было установлено. Более того, имеющиеся в нашем распоряжении анамнестические данные не позволяют определить характер пороков развития у ребенка и, тем более, установить их природу. Невозможно также оценить вклад каждого из супругов в осложненный репродуктивный анамнез, т. к. отсутствуют данные о числе браков и другие данные генеалогического анализа. Поэтому вопрос о влиянии варианта 9ph на аномальную сегрегацию хромосом, равно как и его участие в других репродуктивных проблемах по-прежнему нельзя считать окончательно решенным. Вместе с тем, анамнестические данные позволяют отнести носителей варианта 9ph в группу повышенного риска и рекомендовать им при отягощенном акушерском анамнезе пренатальное кариотипирование.

Таким образом, частота несбалансированного кариотипа при наличии хромосомных перестроек у родителей зависит от многих факторов: хромосомой природы и размеров фрагментов, вовлеченных в перестройку, наличия/отсутствия в них гетерохроматина; от частоты рекомбинации и локализации точек разрывов в R- или G-сегментах хромосом. У гетерозигот по хромосомным перестройкам конъюгация хромосом несовершенна и создает условия для аномальной сегрегации хромосом. Эти аномалии ограничены хромосомами, вовлеченными в перестройку, и не затрагивают другие хромосомы. При наличии несбалансированного хромосомного набора механизмы селекции препятствуют прохождению постмейотических стадий сперматогенеза, поэтому большая часть хромосомных aberrаций, в том числе и несбалансированных, наследуется от матери.

6.3. Численные хромосомные аномалии кариотипа у родителей

Как ни парадоксально, но при кариотипировании супружеских пар с репродуктивными проблемами (бесплодие, невынашивание) выявляются носители не только структурных перестроек хромосом, но и анеуплоидных кариотипов. Большинство численных аномалий кариотипа, не сопровождающихся фенотипическими отклонениями, представлено анеуплоидией в системе половых хромосом. Однако многие из аутосом могут быть представлены мозаичной формой анеуплоидии с небольшим содержанием аномальных клеток в лимфоцитах периферической крови. Некоторые случаи «скрытого» соматического мозаицизма могут оказаться истинными мозаиками. Существующее мнение о бесплодии, которое с неизбежностью входит в комплекс аномалий развития при анеуплоидии, нуждается в уточнении. Учитывая широкие возможности вспомогательных репродуктивных технологий в преодолении бесплодия, вопрос о необходимости включения кариотипирования любой супружеской пары в программы обязательного обследования в рамках ЭКО становится особенно актуальным.

6.3.1. Мозаичные варианты трисомии 21

Как правило, носители аутосомных анеуплоидных наборов хромосом у человека нежизнеспособны. Единственным исключением является Тс21, при которой пациенты могут достигать репродуктивного возраста. У мужчин с Тс21 обычно отмечаются тяжелые формы нарушения сперматогенеза (азооспермия и олигоспермия) [801]. Известно, что дополнительная хромосома 21 нарушает процессы конъюгации хромосом в профазе I (см. главу 4), приводит к блокированию гаметогенеза и, в конечном счете, к бесплодию. Однако в случае преимущественного формирования нормального бивалента и утраты унивалента хромосомы 21, как это было показано при исследовании мейотических хромосом у мужчины с синдромом Дауна [373], часть сперматоцитов способна завершить мейоз с образованием нормальных гамет. Однако сведения о частоте образования нормальных гамет у таких пациентов отсутствуют, а рождение детей пациентами с полной цитогенетической формой синдрома Дауна вследствие физиологических и психологических ограничений происходит крайне редко [134]. Скорее, такие пациенты являются носителями мозаичного кариотипа, который отме-

чается примерно в 5% всех случаев синдрома Дауна [31]. Известны также случаи скрытого соматического мозаицизма Тс21, не имеющего клинических проявлений и не оказывающего негативного влияния на репродуктивную функцию. Так, нами проведена пренатальная диагностика у двух фенотипически нормальных, клинически здоровых беременных, у которых в лимфоцитах периферической крови было установлено присутствие клеточной линии с Тс21. Обе пациентки имели в анамнезе детей с синдромом Дауна и обращались на пренатальную диагностику дважды. Во всех четырех случаях у плодов была установлена полная форма Тс21.

Следует отметить, что многие случаи фенотипически не проявляющегося хромосомного мозаицизма, особенно при малой пропорции аномальных клеток, остаются нераспознанными. Проблему диагностики «скрытого» мозаицизма, т. е. недоступного для выявления при стандартном кариотипировании, иногда удается решить при использовании более чувствительных методов FISH и ПЦР. Известно также, что мозаичный кариотип может быть ограничен только какой-либо одной тканью (ограниченный тканевой мозаицизм) или представлен во всех тканях организма (генерализованный, или истинный, мозаицизм). На практике заключение о кариотипе основано на результатах цитогенетического и ДНК-анализа лимфоцитов, а регистрируемый мозаицизм относится либо к истинному, либо к ограниченному лимфоидной тканью, т. е. соматическому мозаицизму. Очевидно, что установление характера мозаицизма требует изучения клеток различных тканей, что, как правило, не представляется возможным. Поэтому нельзя исключить, что случаи анеуплоидного потомства у родителей с нормальным соматическим кариотипом могут быть обусловлены гонадным мозаицизмом (см. раздел 6.4).

6.3.2. Аномалии числа половых хромосом

Большинство численных аномалий кариотипа, обусловленных дисбалансом гоносом или наличием дополнительных маркерных хромосом, совместимо с жизнью и даже с деторождением. Однако численные аномалии в той или иной мере влияют на процессы созревания гамет и часто ведут к бесплодию. Многие носители этих аномалий являются пациентами центров по бесплодию, невынашиванию и репродуктологии.

Общая частота носителей численных аномалий половых хромосом в популяции оценивается в 0,43% [810].

6.3.2.1. Синдром Клайнфельтера (47,XXY)

Полная форма синдрома Клайнфельтера сопровождается азооспермией, которая, как правило, и является причиной бесплодия [263]. При мозаичном XXY/XY кариотипе нарушения сперматогенеза могут быть менее выраженными. Исследование хромосом и синаптонемных комплексов на стадии пахитены показало, что клетки с набором гоносом XXY способны вступать в мейоз, однако половой бивалент XY из-за преимущественной конъюгации двух X-хромосом, не образуется, что приводит к блоку мейоза [615]. При гетерологичном оплодотворении яйцеклеток хомячка частота дисомных XY сперматозоидов у пациентов с мозаичным XXY/XY кариотипом составила 0,92 %, а при FISH-анализе сперматид и сперматозоидов — 8,09 %, т. е. частота дисомных гамет оказалась существенно выше, чем в контрольной группе (0,11 %). Частота дисомных XX сперматозоидов также оказалась повышенной (3,46 %) (контроль 0,10 %), тогда как частоты YY и диплоидных сперматозоидов не отличались от контрольных величин (0,10 и 0,16 % соответственно) [451]. Эти результаты позволили предположить, что анеуплоидные XX и XY сперматозоиды не являются продуктами мейотического деления XXY клеток, а скорее возникают вследствие аномальной сегрегации половых хромосом при делениях клеток из нормальной 46,XY линии, представленной в тканях семенника у мозаиков XXY/XY [200]. Аналогичная ситуация возможна и при гонадном мозаицизме у пациентов с полной формой синдрома Клайнфельтера, у которых сперматоциты XY возникают при митотических делениях сперматогоний с кариотипом 47,XXY.

Таким образом, в случаях сохранения репродуктивной функции при синдроме Клайнфельтера следует помнить, что частота сперматозоидов с дисомией половых хромосом (XX и XY) на порядок превышает долю анеуплоидных по половым хромосомам сперматозоидов в образцах эякулята у пациентов с нормальным кариотипом 46,XY.

6.3.2.2. Синдром дисомии по Y-хромосоме (47,XYY)

Влияние 47,XYY на сперматогенез варьирует от нормоспермии до азооспермии [801]. Поскольку сперматогенез у таких субъектов обычно не нарушен, предполагалось, что перед вступлением в мейоз дополнительная Y-хромосома утрачивается. Однако в настоящее время убедительно доказано наличие клеток с XYY конституцией на всех стадиях сперматогенеза — от сперматогоний до сперматид [503]. При иссле-

довании мейотических хромосом показано, что конъюгация половых хромосом происходит преимущественно между двумя Y-хромосомами с образованием унивалента X-хромосомы или между X-хромосомой и одной из Y-хромосом [503]. Такой тип конъюгации не препятствует образованию полового пузырька и нормальному завершению мейоза. Однако при образовании тривалента, что происходит гораздо реже, мейоз блокируется [487]. Анализ хромосомного набора методом гетерологичного оплодотворения не выявил увеличения частот YY, однако обнаружил увеличение дисомных XY-сперматозоидов [599]. Методом FISH было также показано существенное увеличение частоты дисомных XY и YY сперматозоидов, однако уровень XX и диплоидных сперматозоидов не превышал контрольных значений [451].

Таким образом, для индивидуумов с кариотипом 47,XYY, как и с 47,XXY характерно увеличение частоты сперматозоидов, несущих одновременно X- и Y-хромосомы, что повышает вероятность рождения детей с синдромом Клайнфельтера и дисомией Y.

6.3.2.3. Синдром Трипло-Х (47,XXX)

Частота синдрома трипло-Х среди новорожденных девочек составляет 1:1000 [31]. В большинстве случаев как его полная, так и мозаичная (XX/XXX) формы не сопровождаются отклонениями в психическом, физическом и половом развитии. Лишь у некоторых индивидов отмечаются нарушения репродуктивных функций (аменорея, дисменорея, ранняя менопауза и др.) или слабо выраженные аномалии развития наружных половых органов и в редких случаях легкая форма умственной отсталости. В подавляющем большинстве женщины с кариотипом 47,XXX выявляются случайно. Как правило, они имеют нормальную плодовитость, однако риск спонтанных абортов и анеуплоидии у потомства повышен [655].

6.3.2.4. Синдром Шерешевского–Тернера (45,X и другие аномалии кариотипа)

Моносомия X (полная и мозаичная формы, а также частичная анеуплоидия, обусловленная абберациями второй половой хромосомы) сопровождается различными фенотипическими признаками синдрома Шерешевского–Тернера, ведущими из которых являются аномалии развития гонад и недоразвитие половых органов.

При отсутствии Y-хромосомы индифферентные гонады развиваются в эмбриональные яичники с ооцитами I порядка. У таких эмбрионов до конца 3-го месяца развития яичники не отличаются от яичников нормальных XX эмбрионов. Позже происходит прогрессирующая дегенерация герминальных клеток и разрастание соединительной ткани [773]. Гонады взрослых пациентов представлены соединительнотканными тяжами, содержащими либо недифференцированные рудименты, половая принадлежность которых не устанавливается, либо рудименты женских гонад без овариальных элементов.

Спонтанное развитие вторичных половых признаков выявляется, в среднем, у 5–20% пациентов с синдромом Шерешевского–Тернера (у 14% пациентов с кариотипом 45,X и у 32% — с мозаичной формой моносомии X или со структурными перестройками X-хромосомы) [811], тогда как спонтанные менструации — только у 2–5% пациентов [773]. Морфологически нормальные яичники визуализируются у 18% пациентов [695], при этом значительно чаще у носителей мозаичных кариотипов 45,X/46,XX и 45,X/47,XXX [695, 711]. Крайне редко обнаруживаются примордиальные фолликулы [48]. Отмечены отдельные случаи нормальной функции яичников у пациенток с моносомией X [780].

Физиологическая беременность наступает у 3,6–7,6% пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера [423, 811]. Как правило, функция деторождения сохраняется у носительниц мозаичного кариотипа 45,X/46,XX [471, 507, 590] и у носительниц aberrантных X-хромосом [208, 219, 265, 825]. Оказалось, что для репродуктивной функции достаточно фрагмента второй X-хромосомы, представленного минорной клеточной линией в лимфоцитах периферической крови [507, 590] и в тканях матки и яичников [723].

В последнее время появляются сообщения о наступлении беременности и рождении здоровых детей у женщин с синдромом Шерешевского–Тернера при помощи вспомогательных репродуктивных технологий (программы донорства яйцеклеток и суррогатного материнства) [272, 544, 858]. Однако 40% беременностей заканчиваются выкидышами [434], а в 30% случаев прогрессирующих беременностей у плодов обнаруживаются врожденные аномалии (спинномозговые грыжи, пороки сердца) и хромосомные болезни [773].

При структурных aberrациях Y-хромосомы в зависимости от типа хромосомной перестройки и процентного соотношения различных

клонов при мозаичной форме наблюдается варьирование фенотипа от женского с признаками синдрома Шерешевского–Тернера до мужского с нарушением фертильности [860]. С использованием внутрицитоплазматической инъекции сперматозоидов человека в ооциты мыши мы проанализировали хромосомный набор сперматозоидов от пациента с кариотипом 45,X/46,X,der(Y) и олигоастенотератозооспермией. Соотношение X- и Y-несущих сперматозоидов у пациента с кариотипом 45,X/46,X,r(Y) не отличалось от 1:1, что дает основание полагать, что только сперматоциты с Y-хромосомой способны вступать в мейоз и завершать его с образованием зрелых сперматозоидов. Следует отметить, что частота анеуплоидных по аутосомам сперматозоидов у пациента не отличалась от контроля, что указывает на отсутствие какого-либо межхромосомного эффекта, однако было отмечено повышение частоты полиплоидии и гиперплоидии по половым хромосомам (4,70 и 11,76% соответственно). И если образование сперматозоидов 24,X,der(Y) связано с нарушением расхождения половых хромосом в первом мейотическом делении, то полиплоидные сперматозоиды могут возникать вследствие задержки цитотомии как в первом, так и во втором мейотических делениях. В нашем исследовании также было обнаружено повышение частоты сперматозоидов со структурными перестройками хромосом (29%) по сравнению с контрольной группой, что, возможно, связано с аномальным спариванием хромосом в мейозе [185].

Случаи обращения на пренатальную диагностику пациентов с синдромом Шерешевского–Тернера при физиологической беременности крайне редки. Однако по мере развития медицинских технологий, в том числе методов вспомогательной репродукции, возможности преодоления бесплодия возрастают.

В нашей практике зарегистрировано 4 случая пренатальной диагностики у беременных, являющихся носителями мозаичных кариотипов X/XXX/XX с доминирующей клеточной линией 46,XX в лимфоцитах. У двух из пациенток в анамнезе при физиологических беременностях отмечено наличие спонтанных выкидышей разного срока. По результатам пренатальной диагностики, во всех четырех случаях кариотип у плодов оказался нормальным.

Нами проведена также пренатальная диагностика у двух пациенток с кариотипом 46,X,del(Xp21→pter) (рис. 6.7). Сестры (монозиготные

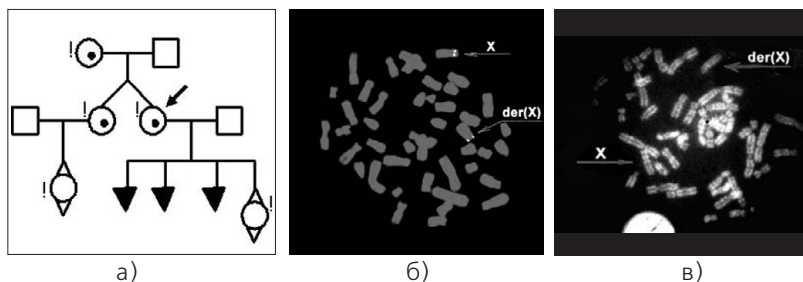


Рис. 6.7. Наследование aberrантной X-хромосомы (а). Метафазные пластинки из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови пробанда (б, в): б — FISH с локус-специфическим зондом Xp21(965C5) (кариотип 46,X,del(X)(p21→pter); в — поздняя репликация aberrантной X-хромосомы (метод RBA)

близнецы) и их мать имели выраженные признаки синдрома Шерешевского–Тернера. Все беременности у носительниц aberrантных X-хромосом в этой семье наступали естественным образом. У одной из сестер три беременности закончились спонтанными выкидышами в ранние сроки. При четвертой беременности проведена пренатальная диагностика. Второй сестре пренатальная диагностика проведена при первой беременности. В обоих случаях был установлен нормальный женский кариотип у плода, и беременности завершились рождением здоровых девочек.

Таким образом, учитывая высокую вероятность образования несбалансированных гамет у пациентов с любой цитогенетической формой синдрома Шерешевского–Тернера, в случае наступления физиологической беременности необходимо пренатальное кариотипирование. При использовании вспомогательных репродуктивных технологий для лечения бесплодия целесообразно проведение доимплантационной пренатальной диагностики.

6.3.3. Сверхчисленные маркерные хромосомы (47,XX,+mar или 47,XY,+mar)

Маркерными принято называть аномальные неидентифицируемые хромосомы [510]. Частота носителей маркерных хромосом составляет 1:1000 в популяции; 3,27:1000 среди пациентов с умственной отсталостью; 1,95:1000 при бесплодном браке и 2,93:1000 у пациентов с аномалиями половой дифференцировки [433]. Сверхчисленные маркерные хромосомы в пренатальном периоде выявляются с частотой 0,6–0,96:1000 [482].

Все маркерные хромосомы подразделяют на следующие группы: возникшие *de novo* и семейные, мозаичные и немозаичные, спутничные и без спутников. В зависимости от хромосом, принимающих участие в их образовании, а также от принадлежности к той или иной группе, они могут проявляться фенотипически или скрытно передаваться в ряду поколений. Среди пациентов, нуждающихся в пренатальной диагностике, носители маркерных хромосом встречаются редко.

Из 6 случаев пренатальной диагностики в связи с носительством маркерных хромосом (табл. 6.4), наследование в трех поколениях прослежено в двух семьях (рис. 6.8, 6.9). В одной семье (рис. 6.9) пренатальная диагностика проведена при двух беременностях (случаи 1 и 2 табл. 6.4). Первая диагностика закончилась рождением здоровой девочки, унаследовавшей родительскую маркерную хромосому. При следующей беременности у плода установлен нормальный мужской кариотип. В случаях 1–4 (табл. 6.4) маркерные хромосомы были представлены бисателлитами, которые оказались короткими плечами хромосом 13 или 21 (случаи 1 и 2) и 14 или 22 (случаи 3 и 4). К сожалению, более точно идентифицировать маркерные хромосомы не удалось. Полученные данные подтверждают мнение об относительной нейтральности наследуемых маркерных хромосом, особенно если они представлены спутничными вариантами [749]. Однако наличие спонтанных выкидышей позволяет предполагать, что риск нерасхождения хромосом, приводящий к анеуплоидии, у носителей сверхчисленных маркерных хромосом существенно выше популяционного [433]. Кроме того, дисбаланс по рибосомным генам, обусловленный увеличением количества их активных копий, также, по-видимому, может в некоторых случаях неблагоприятно сказываться на развитии плода и проявляться после рождения [101, 117, 705]. Предполагается также, что наличие маркерных хромосом увеличивает вероятность однородительской дисомии по участкам, представленным в маркерной хромосоме [519]. Нельзя поэтому исключить, что в случае 5 унаследованный от матери фрагмент хромосомы 7 (рис. 6.10)* мог иметь фенотипическое проявление. Для материнской хромосомы 7 и особенно ее длинного плеча считается установленным эффект импринтинга, следствием которого может быть задержка развития в случае полной или частичной однородительской дисомии [566]. Сведения о состоянии беременности на момент проведения диагностики и развитии ребенка в течение

* Рисунок на цв. вкл.

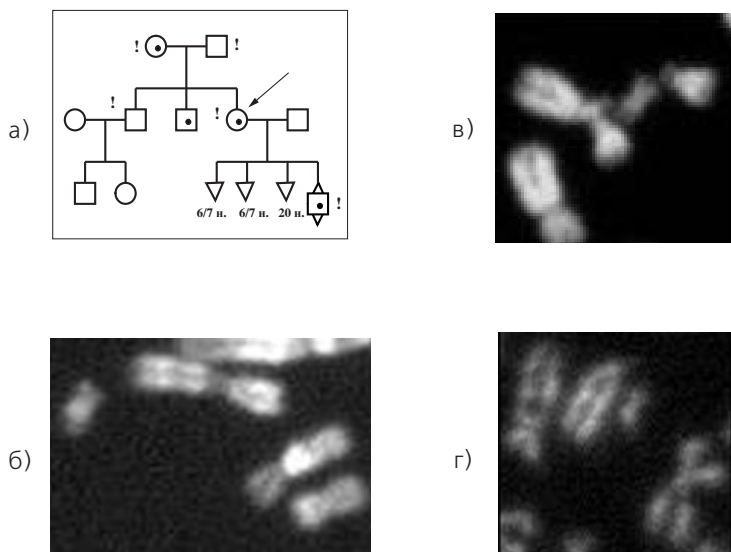


Рис. 6.8. Наследование маркерной хромосомы в семье 4172 (а). Фрагменты метафазных пластинок из лимфоцитов периферической крови (б, в) и клеток цитотрофобласта (г), окраска QFН/АсD: б — пробанд (47,XX,+tar); в — мать пробанда (47,XX,+tar/46,XX); г — плод (47,XY,+tar)

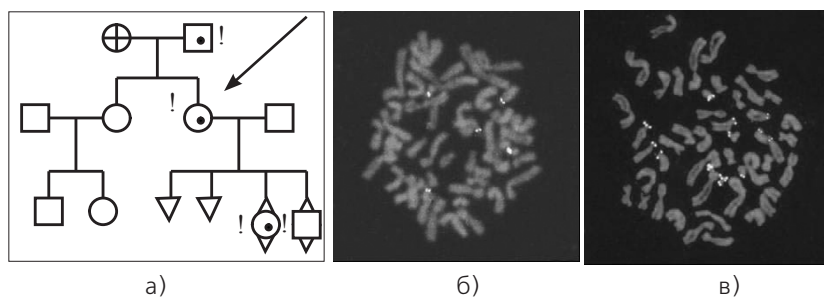


Рис. 6.9. Наследование и идентификация маркерной хромосомы *der(13 or 21)* в семье 2286 (а). FISH с *rDNA* (б) и с ДНК-зондом *D13Z1/D21Z1* (в) на «прямых» препаратах из цитотрофобласта плаценты (16 недель беременности)

Таблица 6.4. Результаты пренатальной диагностики при наличии маркерных хромосом (47,XX,+mar) у родителей

№	Лаб. индекс	Кариотип пробанда	Идентификация маркерной хромосомы	Кариотип плода (по клеткам цитотрофобласта)
1	2286	47,XX,+mar	der(21 or 13)	47,XX,+mar
2	3915	47,XX,+mar	der(21 or 13)	46,XY
3	2754	47,XX,+mar	der(22 or 14)	47,XX,+mar
4	4172	47,XX,+mar	der(22 or 14)	47,XX,+mar
5	2808	47,XX,+mar/ 46,XX	der(7)	47,XY,+mar
6	8018	47,XY,+mar	der(15)	47,XX,+mar

10 лет позволяют надеяться, что в этом конкретном случае носительство der(7), как и у матери, не будет сопровождаться фенотипическими и клиническими аномалиями.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что все случаи численных аномалий кариотипа, обусловленные как целыми хромосомами, так и их фрагментами, могут быть причиной нарушения репродуктивной функции как вследствие патологии формирования гонад, так и возникновения несбалансированного набора хромосом в гаметогенезе или в клетках зародыша на ранних стадиях эмбриогенеза.

6.4. Другие наследственные факторы анеуплоидии

Клинические наблюдения повторных случаев рождения детей с хромосомными болезнями, а также спонтанных абортусов с трисомиями в некоторых семьях с нормальным кариотипом, свидетельствуют в пользу существования генетических факторов риска возникновения геномных мутаций. В качестве таких факторов рассматриваются хромосомный мозаицизм, гетероморфизм гомологов и наличие специфических генов, осуществляющих контроль за сегрегацией хромосом.

Как уже отмечалось (см. раздел 6.3.1) одной из причин, приводящих к нерасхождению хромосом и повторному рождению детей с различными трисомиями, является скрытый гонадный мозаицизм у матери [751].

Гонадный мозаицизм, то есть присутствие в гонадах родителей наряду с нормальными, эуплоидными половыми клетками, клонов анеуплоидных клеток, дающих начало гаметам с анеуплоидным числом хромосом или с несбалансированными хромосомными аберрациями, является одним из вариантов ограниченного тканевого мозаицизма. Он может затрагивать

как мужские, так и женские гонады. Доказательства существования гонадного мозаицизма получены как для моногенных (например, для миодистрофии Дюшенна) [381], так и для хромосомных болезней [503].

Естественно, что прямые доказательства наличия гонадного мозаицизма могут быть получены только при анализе хромосомного набора тканей гонад и пулов генеративных клеток. Так, методом FISH у мужчин с кариотипом 47,XY⁺Y в биоптатах семенников показано наличие двух пулов сперматогониев — с кариотипом XY⁺Y (87%) и с кариотипом 46,XY (13%) [503]. Повышенная частота сперматозоидов с дисомией 21, выявленная методом гетерологичного оплодотворения (см. главу 5), также может рассматриваться как косвенное доказательство существования мозаицизма в тканях семенника. Однако, учитывая особенности конъюгации хромосом в триаде (см. главу 4), а также доказанную экспериментально аномальную сегрегацию хромосом в нормальном клоне (см. раздел 6.3.2), установить, какой из клонов (нормальный или анеуплоидный) функционирует с образованием зрелых анеуплоидных гамет, весьма затруднительно.

В отличие от сперматогенеза, исследования материала биоптата овариальных тканей для получения прямых доказательств гонадного мозаицизма у женщин репродуктивного возраста на практике не используются. Косвенными аргументами в пользу наличия мозаицизма в яичниках служат лишь данные о наличии детей с одной и той же анеуплоидией у женщин с нормальным кариотипом. Однако при детальном изучении родословных, в которых отмечалось регулярное рождение детей с синдромом Дауна в разных поколениях, оказалось, что у матерей и бабушек в некоторых семьях нарушен процесс сегрегации хромосом в клетках всех тканей, включая ткани яичника [888].

Таким образом, реально гонадный мозаицизм встречается достаточно редко. Поэтому его наличием нельзя объяснить все случаи повторных анеуплоидий у потомства, а рождение sibсов с различными анеуплоидиями свидетельствует в пользу существования и других факторов, предрасполагающих к нерасхождению хромосом и приводящих к повторным случаям геномных мутаций у потомства.

К таким факторам относят некоторые полиморфные варианты хромосом в кариотипе родителей, которые приводят к структурному гетероморфизму гомологов. В первую очередь, это районы 1qh, 9qh, 16qh и Yqh, которые благодаря различиям в размерах блоков конститутивного

гетерохроматина могут затруднять конъюгацию хромосом в профазе I и, как следствие, способствовать их аномальной сегрегации в анафазе первого или второго делений мейоза [117, 354]. Однако прямых доказательств негативного влияния гетероморфизма гетерохроматиновых блоков этих хромосом, как и в случае 9ph (см. раздел 6.2.3) на поведение других хромосом в мейозе не получено.

К «цитогенетическим» факторам нерасхождения хромосом групп D и G также относят особенности их коротких плеч, которые являются компонентами ядрышка на стадии интерфазы и могут влиять на расхождение хромосом на других стадиях клеточного цикла. В частности, широко обсуждалась проблема корреляции между аномальной сегрегацией хромосом в мейозе и образованием устойчивых ассоциаций ядрышкообразующих хромосом, регистрируемых в соматических клетках, а также присутствием в кариотипе одного из супругов экстраварианта ядрышкообразующего района, так называемого двойного ЯОР (дЯОР) [514, 681, 857]. В дЯОР число копий рибосомных генов обычно в 5–6 раз превышает среднее количество копий в единичных ЯОР [464], хотя часть из них может быть инактивирована посредством метилирования [254, 412]. Поскольку при трисомии 21 дополнительная хромосома, как правило, наследуется от родителя-носителя дЯОР, предполагается, что именно этот хромосомный вариант нарушает нормальную конъюгацию гомологов и влияет на расхождение других ацентрических хромосом, ассоциированных в ядрышке [636, 681].

Еще одним фактором, влияющим на расхождение хромосом, может быть полиморфизм альфоидных ДНК, входящих в состав прицентромерных районов акроцентрических хромосом. Как уже упоминалось (см. главу 2), прицентромерные районы хромосомы характеризуются набором последовательностей, специфических по нуклеотидному составу и вариабельных по числу повторов. Однако результаты исследований методом FISH с использованием специфичного к центромерному району хромосомы 21 ДНК-зонда (α RI-6) не подтверждают участия альфоидных ДНК в аномальной сегрегации хромосом 21 [880].

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные о влиянии структурно-функциональных особенностей коротких плеч акроцентрических хромосом на их поведение в мейозе весьма противоречивы, а их участие в аномальной сегрегации хромосом требует дополнительных доказательств.

Учитывая многочисленные экспериментальные данные на растениях и лабораторных млекопитающих нельзя исключить, что случаи повторных анеуплоидий в одной семье объясняются существованием генов, ответственных за нормальную сегрегацию хромосом в митозе и мейозе.

Впервые гипотеза о наличии специфических «генов анеуплоидии» была сформулирована в 1976 году [838]. Так как дети у одних и тех же кариотипически нормальных родителей могут иметь одну и ту же хромосомную болезнь, а могут и разные, то гены, ответственные за возникновение геномных мутаций, логично были подразделены на гомоанеуплоидные (т. е. приводящие к нерасхождению одних и тех же хромосом) и гетероанеуплоидные (т. е. влияющие на сегрегацию разных хромосом) [462]. В пользу существования таких генов, возможно, наследуемых по аутосомно-рецессивному типу, свидетельствуют результаты исследования частот рождения детей с трисомией 21 в близкородственных браках [218]. Эта гипотеза, однако, не получила широкого признания [884]. Между тем, многочисленные факты повторного рождения детей с хромосомной патологией, прослеживаемой даже в ряду поколений, свидетельствуют в пользу существования наследственной предрасположенности к нерасхождению хромосом. Каковы конкретные механизмы возникновения повторных анеуплоидий (гомоили гетеро-), и какой ген (или гены) может обладать таким эффектом, остается неясным.

На эту роль в первую очередь могут претендовать гены, продукты которых принимают непосредственное участие в процессах рекомбинации и сегрегации хромосом в мейозе, а также в генах-регуляторах мейоза и митоза. В качестве таких кандидатов могут быть гены, контролирующие синтез ДНК (MTFR), клеточный цикл (MAD2 и BUB1), гены структурных белков синаптонемного комплекса, ферментов пост-мейотической репарации, а также белков, отвечающих за сегрегацию хромосом [804].

Как уже упоминалось, многие гены, контролирующие процесс гаметогенеза, осуществляют свои функции как в мужском, так и в женском мейозе. Однако, если жесткие механизмы селекции мужских гамет могут препятствовать формированию сперматозоидов с хромосомными aberrациями, то при созревании ооцитов и в первых делениях дробления зиготы механизмы селекции анеуплоидных клеток

либо отсутствуют, либо не так эффективны [489, 653]. Следовательно, наследственные факторы, способствующие возникновению хромосомных aberrаций, во время мужского и женского мейоза могут быть совершенно различными. Установить природу ведущего повреждающего фактора, как правило, не удастся, а фрагментарность сведений, касающихся генов предрасположенности к нерасхождению хромосом в мейозе, обусловлена сложностями в проведении подобных исследований на человеке.

Тем не менее, накопленные к настоящему времени данные позволяют рассматривать некоторые гены в качестве факторов риска аномальной сегрегации хромосом в мейозе.

В первую очередь, это гены, мутации в которых вызывают болезни, связанные с хромосомной нестабильностью. Под нестабильностью хромосом обычно понимают увеличение спонтанной и/или индуцированной частоты хромосомных aberrаций, сестринских хроматидных обменов (СХО) и аномальной сегрегации хромосом в соматических клетках [124]. Всего известно около 15 моногенных нозологических форм, сопровождающихся повышенной ломкостью хромосом. Наиболее изученными являются синдром Робертса (преждевременное расхождение центромер), анемия Фанкони (повышенная частота сестринских хроматидных обменов), синдром Луи–Бар (повышенный уровень спонтанных хромосомных aberrаций и транслокаций с вовлечением хромосом 7 и 14). Известны также заболевания, ассоциированные с нестабильностью хромосом вследствие их нерасхождения в соматических клетках в процессе эмбриогенеза. Наиболее известные из них — синдром Ротмунда–Томсона (мозаичная форма трисомии 8 в соматических клетках) и синдром мозаичной смешанной анеуплоидии (MVAS, OMIM 257300). Предполагается, что мутации в генах, ответственных за возникновение этих болезней, являются митотическими, т. е. затрагивают только соматические клетки. Не исключено, однако, что аналогичное действие они проявляют в мейотических делениях и в первых делениях дробления зиготы. По крайней мере, мутации в генах при синдромах Робертса, Ротмунда–Томсона, MVAS, как и при синдроме Эппл–Пиль (OMIM 243605), мозаичной анеуплоидии с преждевременным разделением хроматид (OMIM 176430), относят к мутациям, возникающим в герминативных клетках [804]. Большинство из этих синдромов диагностируются после рождения и приводят к инвалиди-

зации или ранней детской смертности. Поэтому оценить влияние на расхождение хромосом в мейозе у таких больных не представляется возможным. Определенная информация на эту тему может быть получена только на модельных объектах. В частности, на трансгенных мышах показано, что мутации в гене *Fac* (анемия Фанкони) приводят к блоку сперматогенеза и гипоплазии яичников, в гене *Atr/Atm* (атаксия — телеангиэктазия, или синдром Луи–Бар) — к блоку мейоза на стадиях зиготены — пахитены. В экспериментах было доказано наличие не менее 15 генов, мутации в которых сопровождаются нарушением гаметогенеза и ассоциированы с возникновением анеуплоидии в мейозе у мышей [395].

Внедрение методов тестирования аллельного полиморфизма некоторых генов с целью выяснения генных сетей, ответственных за развитие мультифакториальных болезней, позволило получить информацию и о генах предрасположенности к нерасхождению хромосом в мейозе. Например, показана ассоциация аномальной сегрегации хромосом во втором делении мейоза у молодых женщин с аллелью *e4* гена аполипопротеина ApoE [233], а также нерасхождения хромосом и некоторые варианты генотипов по гену пресенелина 1 [243].

Особый интерес вызывают гены, вовлеченные в метаболизм фолиевой кислоты [604], в частности, ген метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR [520], метионинсинтазы MTR [718] и метионинсинтазы-редуктазы MTRR [622]. Несмотря на то, что прямых корреляций между мутациями в этих генах и нерасхождением хромосом пока не получено [457], ведется активное изучение возможных механизмов участия продуктов этих генов в сегрегации хромосом в мейозе. Тестирование полиморфизмов некоторых из перечисленных выше генов включено в генетическую карту репродуктивного здоровья (см. главы 9 и 11).

Предполагается, что нерасхождение хромосом в мейозе может быть обусловлено мобильными диспергированными элементами (МДГ). Последние примечательны тем, что способны индуцировать разрывы хромосом в профазе I мейоза [461]. Репарация этих двунитевых разрывов, имеющих сходство с рекомбинацией, нарушает формирование типичных хиазм и может интерферировать с нормальной сегрегацией мейотических хромосом. Поскольку МДГ-индуцированная репарация происходит в профазе мейоза, то ооциты у пожилых женщин должны

иметь больше таких нарушений, и, соответственно, их хромосомы могут быть в большей степени подвержены нерасхождению.

Тщательный анализ родословных показал, что предрасположенность к повторному рождению детей с анеуплоидным кариотипом наследуется по материнской линии. Сформулировано предположение о цитоплазматическом наследовании факторов, предрасполагающих к нерасхождению хромосом в мейозе, в частности, мутации в митохондриальной ДНК [236]. В пользу этой гипотезы приводят следующие факты. Во-первых, для матерей, в анамнезе которых отмечено неоднократное рождение детей с несбалансированным кариотипом, характерны такие заболевания как болезнь Альцгеймера, диабет и гипотиреоз, в развитие которых определенный вклад вносят мутации митохондриальной ДНК [504, 881]. Во-вторых, мутации в мтДНК нередко способствуют увеличению свободных радикалов при одновременном снижении общего синтеза АТФ. Эти процессы могут влиять на функционирование мейотического аппарата, в частности, нарушать структуру синаптонемного комплекса, снижать активность АТФ-зависимых ферментов рекомбинации и постмейотической репарации, а также дестабилизировать элементы аппарата деления. Предполагается, что мутации митохондриальной ДНК накапливаются с возрастом матери, что собственно и объясняет увеличение частоты анеуплоидии в потомстве женщин старшего репродуктивного возраста [237].

Таким образом, в настоящее время накапливается все больше данных, доказывающих важную роль генетических факторов в нерасхождении хромосом и возникновении анеуплоидии в гаметях и у зародышей человека. Уже известно свыше 15 генов, мутации которых предрасполагают к нерасхождению хромосом в мейозе и митозе. Продукты этих генов входят в состав митотического веретена, контролируют синтез нуклеиновых кислот, ферменты системы репарации ДНК, белки рекомбинации мейотических хромосом, а также системы детоксикации ксенобиотиков.

6.5. Физические и биологические факторы

Анализу мутагенной активности различных химических, физических и биологических факторов посвящена обширная литература [5, 32, 191, 293]. Эти исследования выполнены, главным образом, на экспериментальных животных и на клеточных культурах.

В частности, показано, что радиационное воздействие на различных сроках беременности вызывает аномалии синапсиса хромосом и повышение частоты образования хромосомных аберраций в ооцитах крыс [602, 732], а также увеличение частоты хроматидных разрывов и обменов в ооцитах морской свинки [735]. В то же время, в модельных экспериментах нами не было обнаружено повреждающего эффекта импульсного ультразвука на процесс созревания ооцитов у крыс, на их плодовитость и развитие потомства в двух поколениях, что указывает на безопасность ультразвукового исследования, применяемого с целью пренатальной диагностики [98, 563].

На модельных объектах изучено также воздействие ряда химических факторов на оогенез. Так, цитостатики приводят к нарушению пролиферации гоноцитов и их гибели [54]. Никотин при введении беременным крысам вызывал у половозрелых потомков частичную блокаду сперматогенеза на стадии прелептотены, задержку дифференцировки сперматид, повышение числа гамет с патологией делений созревания. Повреждающее действие на структуру синаптономных комплексов в сперматогенезе мышей оказывают некоторые антибиотики [82]. Введение окситетрациклина мышам на 12–13-й дни беременности, когда основной пул половых клеток в яичниках плодов находится на стадии пролиферирующих оогониев, вызывает повышение патологических митозов. У половозрелых самок из этого потомства обнаружено увеличение количества дегенерирующих ооцитов и фолликулов, а также снижение числа примордиальных фолликулов и овулирующих ооцитов [70]. Алкалоиды, содержащиеся в кофеине, никотине и винбластине, индуцируют появление анеуплоидных ооцитов. Установлена зависимость частоты спонтанных абортот, а также геномных и хромосомных мутаций в ооцитах от дозы кокаина [287].

Прямые данные о влиянии экзогенных факторов на возникновение геномных и хромосомных мутаций в гаметогенезе или раннем эмбриогенезе человека, полученные *in vivo*, немногочисленны. Некоторые из них получены в исследованиях хромосомного компонента сперматозоидов, выполненных с помощью метода гетерологического оплодотворения и FISH. Так, повышенная частота хромосомных аберраций в сперматозоидах человека была зарегистрирована в образцах эякулятов от пациентов, подвергавшихся действию радиации, некоторых промышленных и бытовых ядов, химиотерапии [314, 389, 794, 806].

Предпринимались неоднократные попытки объяснить всплески рождаемости детей с синдромом Дауна воздействиями различных ядов или радиации [804]. Однако утверждение о влиянии экологических катастроф на частоту хромосомных болезней оказывается, по существу, голословным, т. к. не подкреплено данными эпидемиологического мониторинга и анализа механизмов возникновения трисомий. Кажется парадоксальным, но такие глобальные катастрофы как атомные бомбежки в Хиросиме и Нагасаки, авария на Чернобыльской атомной станции и другие, при которых отмечен заметный рост числа некоторых опухолевых заболеваний, частоты и спектра врожденных пороков развития, не привели к сколько-нибудь существенному повышению частоты хромосомных болезней в этих регионах [31, 804].

Вместе с тем, имеются данные, что сравнительно небольшие дозы облучения, полученные во время беременности плодом женского пола, могут быть причиной нерасхождения хромосом в оогенезе, что приводит к рождению во втором поколении плодов с хромосомными болезнями, в том числе с синдромом Дауна [806].

Дело в том, что в отличие от мужских гамет, постоянно обновляющихся на протяжении всей жизни, яйцеклетки закладываются еще во внутриутробном периоде, когда не только возникают первичные половые клетки, но и происходят кардинальные события в оогенезе, связанные с процессом мейоза (см. главу 1). В этой связи важно обратить внимание на тот удивительный, но, к сожалению, часто игнорируемый факт, что каждая яйцеклетка является важным связующим звеном трех последовательных поколений: бабушка, в утробе которой развивается плод женского пола и, соответственно, в организме которого происходят важные начальные этапы мейоза, мать, у которой созревают и овулируют яйцеклетки, и, наконец, новый организм, возникающий после оплодотворения такой яйцеклетки [444].

Таким образом, в отличие от мужских гамет, где весь процесс созревания сперматозоидов, включая мейоз, длится чуть более двух месяцев, а селекция генетически неполноценных гамет весьма эффективна, женские половые клетки чувствительны к внешним воздействиям на протяжении нескольких десятилетий, причем решающие процессы их созревания происходят еще во время внутриутробного развития и непосредственно перед овуляцией. Более того, в отличие от презиготической селекции мужских гамет, селекция генетически неполноценных ооцитов, в основном,

происходит уже после оплодотворения, а подавляющее большинство (более 90%) зародышей с хромосомными и генными мутациями погибает до или во время имплантации. Следовательно, основные усилия по профилактике наследственной и врожденной патологии, в том числе и индуцированной неблагоприятными факторами внешней среды должны быть направлены именно на женский организм. Естественно, это не означает игнорирования повреждений мутагенными факторами мужских гамет, однако, благодаря естественным биологическим особенностям их созревания и селекции, а также разработкам новых вспомогательных репродуктивных технологий, профилактика нарушений репродукции у мужчин в значительной мере упрощается.

Заключение

Геномные и хромосомные мутации в гаметах и развивающихся зародышах являются результатом повреждающего действия как эндогенных, так и экзогенных факторов. К факторам эндогенной природы относятся возраст, наличие хромосомных перестроек в кариотипе родителей. Наличие зависимой от возраста и пола анеуплоидии не вызывает сомнения, но механизмы этих феноменов остаются до конца невыясненными. Соответственно, неясны и возможные пути предупреждения хромосомных аномалий у потомства. Единственным реальным способом их профилактики остается пренатальная диагностика.

У гетерозигот по хромосомным перестройкам конъюгация хромосом несовершенна и приводит к аномальной сегрегации хромосом в мейозе. Частота несбалансированного кариотипа у потомства зависит от величины фрагментов, вовлеченных в перестройку, наличия/отсутствия в них гетерохроматина; от частоты рекомбинации и локализации точек разрывов. Хромосомные аномалии, возникающие в гаметах, подвергаются селекции на постмейотических стадиях созревания мужских, но не женских гамет. Поэтому большинство хромосомных аномалий, в том числе и несбалансированных, наследуются от матери.

Вероятность потомства с несбалансированным кариотипом у носителей Робертсоновских транслокаций определяется спецификой хромосом, вовлеченных в центрическое слияние. Наличие Робертсоновской транслокации в сочетании с ограниченным плацентой мозаицизмом хромосом указывает на возможность однопородительской дисо-

мии у плода, которая может явиться причиной серьезных нарушений в постнатальном периоде развития.

Все случаи численных aberrаций кариотипа, обусловленные как целыми хромосомами, так и их фрагментами, могут быть причиной нарушения репродуктивной функции, как вследствие патологии формирования гонад, так и возникновения генетически несбалансированного набора хромосом в гаметах или в клетках зародыша.

Накапливается все больше данных, доказывающих важную роль генетических факторов в нерасхождении хромосом и возникновении анеуплоидии в гаметах и в клетках ранних зародышей. У человека известно свыше 20 генов, мутации которых предрасполагают к нерасхождению хромосом в мейозе и в митозе. Продукты этих генов контролируют синтез нуклеиновых кислот, входят в состав белков митотического веретена, белков системы репарации ДНК, рекомбинации мейотических хромосом, а также системы детоксикации ксенобиотиков.

Основные усилия по профилактике хромосомных aberrаций, в том числе и индуцированных неблагоприятными факторами внешней среды, должны быть направлены, прежде всего, на женский организм.

ГЛАВА 7 ХРОМОСОМНЫЙ МОЗАИЦИЗМ

Введение

Генетическими мозаиками называют особей — продуктов одной зиготы, в организме которых сосуществуют две или более популяции клеток с различным генотипом. С точки зрения цитогенетики под мозаицизмом понимают сочетание в тканях индивидуума клеточных линий с различным хромосомным набором. При этом смесь клеток с нормальным и аномальным кариотипами может быть представлена во всех тканях организма (так называемый истинный, или генерализованный, мозаицизм), или ограничена клетками какой-либо одной ткани (ограниченный мозаицизм). В связи с этим, нет сомнения, что для полного представления о хромосомном статусе организма необходимо цитогенетическое исследование клеток разных тканей.

Хромосомный мозаицизм при хромосомных болезнях описан для половых хромосом, многих аутосом и целых геномов ($2n/3n$). Мозаичные трисомии выявляются иногда у лиц с нормальным фенотипом, в особенности у некоторых родителей (чаще у матерей) пациентов с хромосомными синдромами [655], а мозаичные моносомии по половым хромосомам являются нормальной физиологической особенностью лиц старшей возрастной группы [663].

Проблема диагностики хромосомного мозаицизма обусловлена тем, что кариотипирование ограничено анализом метафазных хромосом в клетках какой-либо одной ткани, и во всех этих случаях правомочно говорить о межклеточном мозаицизме. Так, в клинической цитогенетике обычно используются лимфоциты периферической крови, в пренатальной диагностике — либо лимфоциты пуповинной крови, либо клетки амниотической жидкости, либо хориона/плаценты. С другой стороны, не решена проблема разграничения между изменчивостью нормального кариотипа и мозаичными вариантами анеуплоидии, осо-

бенно в случаях с очень малой пропорцией аномальной клеточной линии. Большинство исследователей придерживаются мнения, что мозаицизм считается установленным при наличии двух и более метафазных пластинок с одинаковой хромосомной аномалией [187]. При этом в зависимости от типа культивируемой ткани, полученной от нормальных индивидуумов, частота анеуплоидных и полиплоидных метафазных пластинок при модальном диплоидном кариотипе может существенно варьировать, не превышая, однако, 1 % [134]. Уровень спонтанной анеуплоидии в норме варьирует и в зависимости от методов, используемых для анализа. Например, верхний предел спонтанной анеуплоидии по X-хромосоме в культивируемых лимфоцитах составляет 4,04%, а в некультивируемых клетках буккального эпителия — 1,79% [118]. Таким образом, четких критериев для установления мозаичного варианта гетероплоидии не существует. Возможно, по этой причине многие случаи межклеточного и межтканевого хромосомного мозаицизма в норме и в случаях наличия пороков развития у новорожденного или плода остаются нераспознанными.

Впервые факт существования у зародышей млекопитающих мозаицизма, ограниченного экстраэмбриональными тканями был установлен Чарльзом Фордом [432], который обнаружил анеуплоидную клеточную линию только в плодных оболочках мыши. Значительно позже были получены сведения о высокой частоте мозаичных аутомсомных трисомий в культурах клеток плодных оболочек спонтанных абортусов человека [885]. К настоящему времени ограниченный плацентой мозаицизм как вариант физиологической прогрессирующей беременности подтвержден многочисленными результатами пренатальной диагностики.

На особенности внутриутробного развития эмбрионов с хромосомным мозаицизмом, ограниченном клетками плаценты, клиницисты стали обращать пристальное внимание после опубликования результатов цитогенетического исследования плацент у новорожденных с синдромом задержки внутриутробного развития [528]. В 1993 году была создана Европейская ассоциация по исследованию ограниченного плацентой хромосомного мозаицизма (EUCROMIC), основная цель которой — создание коллекции мозаичных случаев, установление причин их возникновения, а также исследование влияния хромосомного мозаицизма на развитие плода [870].

Проблема хромосомного мозаицизма в пренатальной диагностике представляет не только большое практическое значение (см. главу 9), но и привлекает интерес как одна из интригующих проблем биологии развития. Достаточно отметить, что если для зародышей человека доимплантационных стадий мозаицизм хромосом рассматривается как нормальное явление [388], то на более поздних стадиях внутриутробного развития его влияние на течение и исход беременности неоднозначно. По мере накопления данных о совместимости с внутриутробным развитием и живорождением мозаиков с разными типами мозаицизма становится очевидным, что традиционные представления о частоте и фенотипических проявлениях мозаичных случаев гетероплоидии в онтогенезе человека нуждаются в пересмотре.

В главе суммированы современные представления о механизмах возникновения хромосомного мозаицизма и его влиянии на развитие человека.

7.1. Механизмы возникновения хромосомного мозаицизма

Известно, что геномные мутации возникают вследствие нерасхождения или утраты хромосом в гаметогенезе или на ранних стадиях эмбриогенеза (см. главу 3). При этом термин «нерасхождение» относится к любым нарушениям разделения хроматид или гомологичных хромосом в митозе и в мейозе, которые приводят к численным аномалиям кариотипа в результате запаздывания хромосомы в анафазе или преждевременного разделения центромер. Как экстремальный вариант нерасхождения можно рассматривать полиплоидию, которая является результатом нарушения разъединения всех хроматид или гомологичных хромосом.

Рассматривая механизмы возникновения хромосомного мозаицизма, целесообразно напомнить основные этапы раннего эмбриогенеза человека, касающиеся дробления, формирования зародыша и его провизорных органов (подробнее см. главу 1). Так, обособление трофэктодермы от внутренней клеточной массы происходит уже на 8-клеточной стадии, причем в образовании внутренней клеточной массы и собственно эмбриона человека участвуют всего 1–2 клетки, тогда как остальные формируют экстраэмбриональные структуры (рис. 7.1). При этом дифференцировка хориона начинается на стадии поздней морулы, а желточного мешка, аллантоиса и амниона — на стадии бластоцисты (см. главу 1, рис. 1.7).

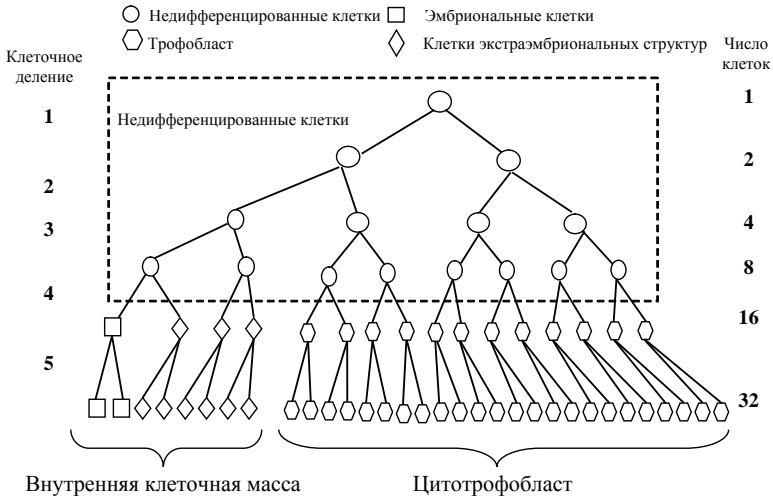


Рис. 7.1. Проспективная судьба клеток в течение пяти делений дробления [337]

Теоретически аномальная сегрегация хромосом возможна при любом митотическом делении клетки. Мозаицизм хромосом, возникающий в эмбриогенезе, может иметь серьезные последствия для антенатального и постнатального развития, что, в конечном счете, будет определяться природой хромосомного дисбаланса, стадией возникновения и локализацией aberrантных клеток в тканях и органах формирующегося организма.

7.1.1. Хромосомный мозаицизм на доимплантационных стадиях

Если жизнеспособная клеточная линия с анеуплоидией возникает в процессе первых делений дробления, морула будет в большей или меньшей степени мозаичной. Очевидно, что размеры aberrантного клона будут определяться стадией возникновения мутации, а также локализацией аномальной клетки в моруле (рис. 7.2, 7.3, 7.4). Если распределение двух клеточных линий происходит случайно, возрастет вероятность возникновения истинных мозаиков с двумя линиями клеток в хорионе и в тканях плода (рис. 7.4, 7.5).

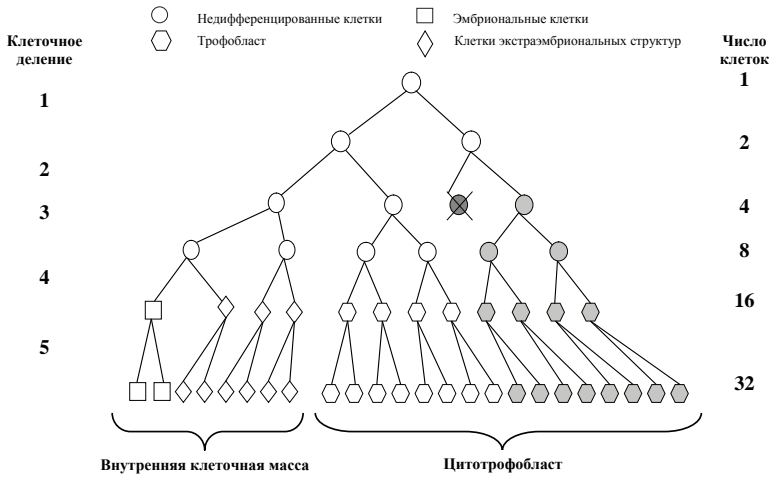


Рис. 7.2. Модель возникновения ограниченного плацентарного мозаицизма при нерасхождении хромосом во втором делении дробления

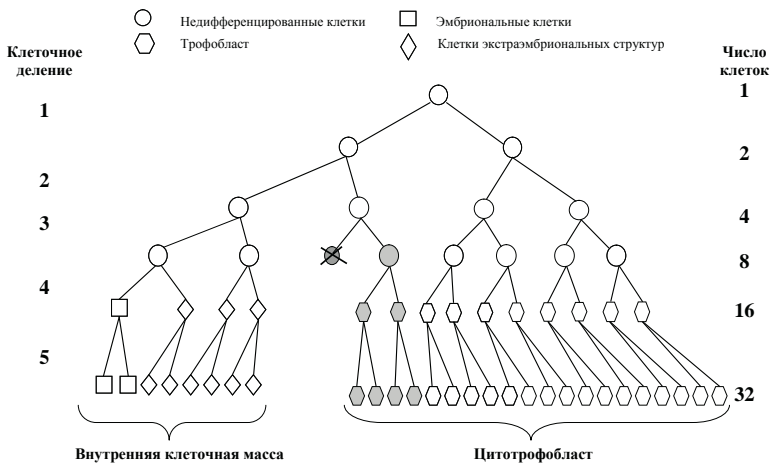


Рис. 7.3. Модель возникновения ограниченного плацентарного мозаицизма при нерасхождении хромосом в третьем делении дробления

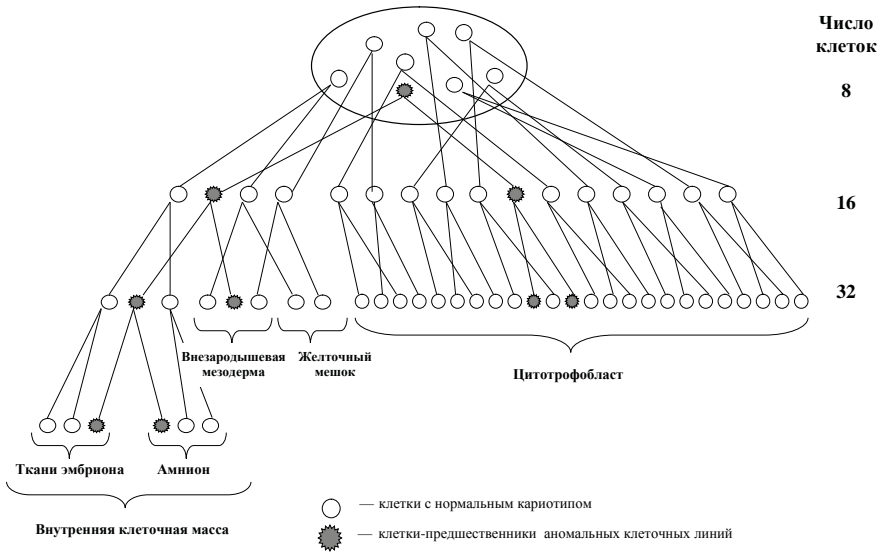


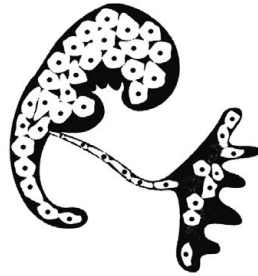
Рис. 7.4. Модель возникновения хромосомного мозаицизма в раннем эмбриогенезе человека

Как показали молекулярно-цитогенетические исследования, около 50% дробящихся эмбрионов человека являются анеуплоидными (см. главу 5). При этом 38–46% морфологически нормальных эмбрионов на стадии 8–10 клеток имеют три и более анеуплоидных бластомера [654]. Число бластомеров, отличающихся по набору хромосом, может достигать половины всех клеток зародыша [331, 653]. Экстраполируя результаты исследования анеуплоидии по четырем парам хромосом методом FISH (X, Y, 13, 18, 21) на весь набор, можно ожидать, что частота мозаичных эмбрионов в период дробления составит не менее 80% [388]. Если это предположение подтвердится в дальнейших исследованиях, то хромосомный мозаицизм следует признать особенностью нормального развития зародыша человека, по крайней мере, до стадии 8–10 клеток.

Аномальная сегрегация хромосом может быть обусловлена такими факторами как репликация без цитокинеза, фрагментация ядра, аномалии движения хромосом в анафазе [654]. Критическим для нормального расхождения хромосом являются завершение репликации, расположение



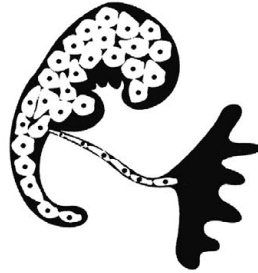
**плацента: мозаицизм
эмбрион: аномальные клетки**



**плацента: мозаицизм
эмбрион: нормальные клетки**



генерализованный мозаицизм



**плацента: аберрантные клетки
эмбрион: нормальные клетки**



**плацента: аберрантные клетки
эмбрион: мозаицизм**



**плацента: мозаицизм
эмбрион: аномальные клетки**

Рис. 7.5. Возможные варианты мозаицизма [271]

хромосом на экваторе и прикрепление кинетохор к микротрубочкам веретена. Незавершенность одного из этих событий приводит к блокированию клеточного цикла на соответствующей стадии и, в конечном счете, — к гибели клетки. Высокая частота аутосомных моносомий и трисомий у дробящихся эмбрионов, сопоставимая с частотой анеуплоидных ооцитов [654], свидетельствует об отсутствии на стадии дробления зиготы механизма селекции клеток с хромосомным дисбалансом [567]. Не исключено, что механизмы, контролирующие клеточный цикл, вступают в силу только после активации генома самого зародыша [455, 834]. По-видимому, процесс восстановления механизмов контроля митотического цикла происходит асинхронно и выражено не во всех клетках. Так, доля гетероплоидных бластомеров на стадии бластоцисты (~ 64 клетки), как правило, снижается по сравнению с дробящимися эмбрионами и составляет в среднем 10,5% [414]. Однако частота морфологически нормальных эмбрионов с мозаичной формой анеуплоидии остается высокой и достигает 40% [309]. Следовательно, мозаичные эмбрионы, имеющие подавляющее большинство гетероплоидных бластомеров, подвергаются элиминации, и переход из стадии морулы в стадию бластоцисты является критическим для дальнейшего развития эмбриона [414].

7.1.2. Хромосомный мозаицизм после имплантации

На постимплантационных стадиях развития хромосомный набор в плодных оболочках, как правило, соответствует кариотипу плода. При этом клеточные линии с аномальным кариотипом могут присутствовать как в тканях плода, так и во внезародышевых оболочках [896]. Хромосомный мозаицизм в тканях плода (т. е. истинный, или генерализованный, мозаицизм) подтверждается в 10% случаев при обнаружении его в плаценте [764] и составляет в общей сложности 0,1% всех развивающихся беременностей [533]. Случаи мозаичной или полной формы гетероплоидии в тканях плода, имеющего нормальный кариотип в клетках провизорных органов, единичны [337], тогда как приблизительно в 2% случаев прогрессирующих беременностей цитогенетические аномалии ограничены плацентой [533].

В зависимости от локализации аномальных клеток в тканях хориона различают три типа ограниченного плацентарного мозаицизма (табл. 7.1).

Таблица 7.1. Типы ограниченного плацентарного мозаицизма

Ткань	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Цитотрофобласт	Анеуплоидия (мозаичная или полная)	Нормальный кариотип	Анеуплоидия (мозаичная или полная)
Мезенхимальная строма хориона	Нормальный кариотип	Анеуплоидия (мозаичная или полная)	Анеуплоидия (мозаичная или полная)
Ткани плода	Нормальный кариотип	Нормальный кариотип	Нормальный кариотип

Наиболее частым считается первый тип мозаицизма, когда анеуплоидные клетки встречаются только в цитотрофобласте. Третий тип является самым редким [533, 789].

Для объяснения высокой частоты анеуплоидных клеточных линий в тканях плаценты по сравнению с тканями плода было высказано несколько гипотез. Первая из них основывается на изначальных различиях числа клеток, формирующих собственно эмбрион и его оболочки [594]. В специальных исследованиях показано, что любой из бластомеров на стадии бластоцисты может принимать участие в формировании эмбриобласта и трофэктодермы [576]. Принимая во внимание равную вероятность аномальной сегрегации хромосом в любом клеточном делении, эти обстоятельства определяют неравное число потенциальных клеток-предшественников аномальных клеточных линий в трофэктодерме и эмбриональных структурах.

С другой стороны, предполагалось, что бластомеры в моруле имеют неслучайное расположение, и одни клетки преимущественно принимают участие в формировании эмбриона, а другие — его провизорных органов [456]. В этой связи следует допустить существование механизма селекции бластомеров, в том числе диплоидных и анеуплоидных, на стадии ~ 32 клеток [518, 541]. На существование такого отбора указывают, в частности, наблюдения за развитием до стадии поздней морулы эмбрионов с многоядерными бластомерами. Так, было показано, что эмбрион формируется только из нормальных бластомеров, тогда как аномальные клетки, возможно, вытесняются в перивителлиновое пространство, отбрасываются вместе с блестящей оболочкой перед имплантацией или принимают участие в формиро-

вании трофэктодермы [654]. Однако прямых доказательств участия многоядерных клеток в формировании трофобласта не получено [388]. Не получило также экспериментального подтверждения предположение, что предшественником трофэктодермы является анеуплоидная клеточная линия, в то время как формирование эмбриона происходит из диплоидных бластомеров. Так, прямые исследования хромосомного набора с использованием метода FISH показали, что на стадии бластоцисты аномальные клетки присутствуют во внутренней клеточной массе и трофобласте. При этом хромосомные аномалии в клетках бластоцисты (моносомия, трисомия, гаплоидия и полиплоидия, хаотичный набор хромосом) не изменяются по сравнению с выявленными у этих же эмбрионов на стадии морулы [309, 414]. Таким образом, первичная дифференцировка бластомеров на трофобласт и эмбриобласт происходит независимо от хромосомного набора, что лишний раз свидетельствует об отсутствии механизма селекции клеток вплоть до стадии поздней бластоцисты. Дальнейшее развитие мозаичного эмбриона определяется характером хромосомной аберрации, локализацией гетероплоидных клеток и степенью выраженности аномального клона. Так, локализация летальных геномных мутаций в эмбриобласте может привести к нарушениям формирования эмбриональных структур, в то время как их локализация в трофобласте — к нарушениям имплантации и формирования хориона. Влияние сублетальных геномных мутаций будет менее выраженным и приведет либо к гибели эмбриона и плода на постимплантационных стадиях развития, либо к рождению ребенка с хромосомными болезнями [309]. Не исключено, что специфические хромосомные аномалии, затрагивающие определенные хромосомы, могут оказывать позитивное влияние на развитие и функции клеток трофобласта на разных этапах формирования дефинитивной плаценты [789]. Это интересное предположение пока лишено фактических доказательств.

Характерной особенностью плаценты при развивающейся беременности является анеуплоидия, затрагивающая ограниченное число клеток в пределах одной ворсины или в различных участках плаценты (типы 1 и 2 ограниченного плацентарного мозаицизма, табл. 7.1) [844]. Локальное распространение анеуплоидии объясняется тем, что аномальные клетки либо утрачивают способность к делению и вступают в апоптоз, или же они преодолевают этот барьер и продолжают деле-

ние [399, 706, 800]. Возможно, для клеток эмбриона существуют контрольные механизмы, ограничивающие или запрещающие пролиферацию гетероплоидных клеток [455]. В трофобласте, по-видимому, этот контроль осуществляется менее жестко, поэтому аномальные клетки клонально пролиферируют, а их элиминация происходит одновременно с последом при рождении [789].

Наличие делящихся анеуплоидных клеток указывает на их жизнеспособность [542], а присутствие клеточных линий с различным набором хромосом — на слабую степень дифференцировки ткани, в которой они возникли [396]. В этом отношении, как и по некоторым другим характеристикам, клетки трофобласта напоминают опухолевые клетки. В частности, спектр хромосомных аномалий дробящихся зародышей человека, особенно в случаях хаотичного набора хромосом в каждом ядре бластомера, напоминает картину, наблюдаемую в малигнизированных клетках [455], в которых гены, контролирующие клеточный цикл, а также апоптозные гены (например, p53, Gadd45, Bcl-xL), часто инактивированы [388]. Вследствие этого могут быть нарушены процессы трансзиции G1, G2/M, и анеуплоидные бластомеры, как и опухолевые клетки, не вступают в апоптоз, а остаются жизнеспособными.

Для объяснения полной дискордантности кариотипов плодных тканей и хориона (тип 3, табл. 7.1) предложена гипотеза «близнецовой беременности», согласно которой при многоплодной беременности на ранней стадии один из эмбрионов может резорбироваться, а другой продолжает развитие [896]. При этом от «исчезающего близнеца» сохраняются лишь фрагменты зародышевых листков, образующие тератомы, или же фрагменты плодных оболочек, входящие в состав провизорных органов развивающегося плода. Поскольку область инвазивного вмешательства при хорионбиопсии ограничена, существует вероятность получения клеток хориона резорбировавшегося близнеца. Между тем, при монозиготической двойне различия по половым хромосомам либо отсутствуют, либо обусловлены утратой половой хромосомы, что сопровождается кариотипом 45,X у одного из плодов [538]. «Исчезновение» близнеца из dizиготической двойни примерно в половине случаев должно было приводить к дискордантности по полу [245], однако мозаицизм (химеризм) 46,XX/46,XY отмечается крайне редко [271]. Более того, дискордантность кариотипов при дизи-

готической двойне следует трактовать как химеризм, так как различающиеся по кариотипу клетки происходят из разных зигот [531]. Таким образом, полное несоответствие кариотипов в клетках хориона и плода (тип 3 плацентарного мозаицизма) скорее обусловлено аномальной сегрегацией хромосом в первых делениях дробления диплоидной или гетероплоидной зиготы.

7.1.3. Хромосомный мозаицизм в постнатальном периоде

По современным оценкам, 20–30% всех случаев трисомии в постнатальном периоде представлены мозаичными формами [449]. У мозаиков обычно отмечают большую продолжительность жизни и более мягкое проявление фенотипических нарушений и клинических симптомов, чем у пациентов с полной формой гетероплоидии. Так, если среди спонтанных абортусов до 28-й недели беременности встречаются, как правило, полные формы триплоидии, то новорожденные, прожившие дольше нескольких дней, являются триплоид-диплоидными мозаиками [31, 187]. Однако накопленные к настоящему времени многочисленные данные свидетельствуют о том, что тяжесть проявления синдромов не зависит от формы анеуплоидии (полная или мозаичная) и доли анеуплоидных клеток в исследуемой ткани. Например, при мозаичной трисомии 21, которая составляет около 5% всех случаев синдрома Дауна [31], трисомная линия может быть представлена лишь в 2–10% лимфоцитов [815], а клинические признаки синдрома Клайнфельтера при полной или мозаичной форме кариотипа 47,XXY могут быть ограничены лишь нарушением сперматогенеза [134].

Как уже упоминалось, мозаичная форма трисомий по разным хромосомам без каких-либо фенотипических проявлений наблюдается у некоторых родителей пациентов с хромосомными синдромами (чаще — у матерей), а также у лиц с неотягощенным генетическим анамнезом [655]. Интересно отметить, что в отличие от трисомий по половым хромосомам и аутосомам, мозаичная форма моносомии X у нормальных индивидов имеет тенденцию прогрессировать с возрастом. Так, кариотип 45,X регулярно отмечается в 2–5% лимфоцитов периферической крови у женщин с 55, а у мужчин — с 65 лет, а доля моносомных по X-хромосоме клеток увеличивается по мере старения [134, 663].

Уникальной естественной биологической моделью для изучения механизмов возникновения структурных aberrаций, нерасхождения

хромосом в мейозе и митозе, сохранения в онтогенезе межклеточного и межтканевого мозаицизма является синдром Шерешевского–Тернера. Его отличительной особенностью является многообразие нарушений половых хромосом и крайне высокая частота мозаичных вариантов кариотипа. При стандартном кариотипировании ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови классическая форма синдрома (моносомия X) регистрируется у 40–60%, структурные перестройки X-хромосом — у 5–10% пациенток, остальные 30–40% случаев представлены мозаичными вариантами анеуплоидии по нормальным или aberrантным X- и Y-хромосомам [31, 643]. В настоящее время твердо установленными особенностями фенотипа синдрома Шерешевского–Тернера можно считать низкорослость и аномалии развития репродуктивной системы. Остальные фенотипические и клинические признаки синдрома носят крайне индивидуальный характер. При этом степень выраженности и сочетание отдельных симптомов не коррелируют с каким-либо определенным типом аномального кариотипа.

На основании различий в частоте рождения носителей полной и мозаичной формы моносомии X выдвинуты гипотезы о влиянии мозаицизма на жизнеспособность эмбрионов [479, 649], а также на формирование комплекса фенотипических признаков синдрома Шерешевского–Тернера [202, 752]. Исследования последних 10–15 лет позволили идентифицировать гены на X- и Y-хромосомах, принимающие участие в развитии репродуктивной и лимфатической систем [270, 410, 684], формировании скелета [400, 429, 683]. С целью выяснения роли эпигенетических факторов в развитии симптомов синдрома Шерешевского–Тернера предпринимаются масштабные исследования по установлению родительского происхождения единственной X-хромосомы [515, 583, 625, 844]. Установлено, в частности, что особенности социально-психологического статуса пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера с кариотипом 45,X зависят от родительского происхождения единственной X-хромосомы. Однако причины гибели 99% плодов с моносомией X по-прежнему остаются невыясненными.

Широкое применение методов ПЦР и FISH в клинко-цитогенетическом обследовании позволило не только обнаружить среди пациенток с моносомией X «скрытых мозаиков» (не выявляемых с помощью традиционных цитогенетических исследований), но и подтвердить существование у них межтканевого мозаицизма [440, 649, 664].

Молекулярно-цитогенетический анализ, проведенный нами при обследовании 88 пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера, позволил установить скрытый мозаицизм в 24 случаях носительства кариотипа 45,X. Из них 6% пациенток оказались «скрытыми мозаиками» по Y-хромосоме и 15% — по X-хромосоме [155]. Согласно данным литературы, частота скрытого мозаицизма может варьировать в широких пределах — по Y-хромосоме от 0% до 61% [447, 699, 753], по X-хромосоме — от 2,4% до 90% [227, 664, 699]. Неоднозначность результатов объясняется объемом и спецификой выборки, а также разрешающей способностью методов анализа. Так, метод ПЦР, вследствие высокой чувствительности и специфичности указывает на наличие дополнительного материала, однако не позволяет оценить представительность клеточной линии. Количественная характеристика клеточных линий возможна по интерфазным ядрам методом FISH, однако, при интерпретации результатов немаловажную роль играют фоновые гибридизационные сигналы и эффективность связывания ДНК-зонда с сайтами-мишенями. Кроме того, установление второй клеточной линии методом FISH существенно зависит от избранных контрольных значений частоты спонтанной анеуплоидии.

В нашем исследовании, как и в других работах [440], критерием для диагностики мозаицизма методом FISH по интерфазным ядрам в периферической крови и в буккальном эпителии было избрано наличие 5% клеток с хромосомным набором, отличающимся от кариотипа в базисном клоне. При этом количественные характеристики уровня анеуплоидии по X-хромосомам разных тканей могут варьировать (2–4,04% для культивируемых лимфоцитов и 1,79% для некультивируемых клеток буккального эпителия) [118, 515]. Следует отметить, что при структурных перестройках, не изменяющих число маркируемых локусов, по гибридизационным сигналам в интерфазном ядре невозможно идентифицировать аберрацию и, соответственно, выявить несущую ее клеточную линию. Поэтому результаты FISH дают основание лишь предполагать, что клеточные линии, выявляемые при метафазном анализе, идентичны регистрируемым по интерфазным ядрам. Таким образом, несмотря на высокую чувствительность методов ПЦР и FISH, исследование мозаицизма нуждается в применении метафазного анализа.

Учитывая, что установление хромосомного мозаицизма зависит не только от методов анализа и числа проанализированных клеток [259, 479], но и от типа тканей, целесообразно исследовать клетки, имеющие

различное эмбриональное происхождение. Результаты, полученные различными методами (табл. 7.2), свидетельствуют о том, что в 79 % случаев мозаичный кариотип присутствует во всех тканях, т. е. является истинным, или генерализованным, и в 21 % случаев ограничен одной тканью. Характерной особенностью истинного мозаицизма по половым хромосомам у пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера является ярко выраженная межтканевая вариабельность в соотношении клеточных линий. При этом, независимо от структурных особенностей

Таблица 7.2. Характеристика мозаицизма у пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера

Ссылка	Число случаев	Анализируемая ткань	Метод исследований	Характер мозаицизма		Характер доминирования	
				Истинный	Ограниченный	В двух тканях	В одной ткани
[105]	3	Фибробласты кожи и гонад	Цитогенетический	3	0	2	1
[649]	56	Кровь, фибробласты кожи	Цитогенетический	32	24	24	8
[752]	5	Кровь, гонады	FISH	5	0	4	1
[664]	13	Кровь, буккальный эпителий	FISH	9	4	2	7
[440]	35	Кровь, буккальный эпителий	FISH	32	3	–	–
[431]	11	Кровь, буккальный эпителий	FISH	11	0	8	3
[227]	2	Кровь, гонады	FISH	2	0	–	–
[692]	2	Кровь, гонады	PCR	1	1	–	–
[901]	2	Кровь, гонады	PCR	2	0	–	–
[301]	39	Кровь, буккальный эпителий	FISH	35	4	28	7
Всего	168			132 (79 %)	36 (21 %)	68 (72 %)	27 (28 %)

второй гоносомы (нормальной или аберрантной X- или Y-хромосомы), доминирование одного и того же клеточного клона сохраняется в тканях, имеющих различное эмбриональное происхождение [155, 301]. Таким образом, результаты исследований половых хромосом в клетках разных тканей у пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера являются экспериментальным подтверждением гипотезы о сохранении возникшей в эмбриогенезе генетической гетерогенности [634] и их селективной нейтральности в постоянно обновляющихся тканях [35].

7.2. Мейотический и митотический мозаицизм

Наиболее частыми случаями мозаицизма являются трисомии по отдельным хромосомам. В зависимости от механизма происхождения трисомии мозаицизм подразделяют на митотический и мейотический.

Митотический мозаицизм возникает вследствие нерасхождения хромосом при дроблении нормальной диплоидной зиготы. Он сопровождается образованием клона трисомных клеток с удвоенной материнской или отцовской хромосомой (рис. 7.6) Мейотический мозаицизм возникает вследствие утраты добавочной хромосомы из триады при дроблении трисомной зиготы и сопровождается формированием клона диплоидных клеток (рис. 7.7). Типы 1 и 2 ограниченного плацентарного мозаицизма относятся, главным образом, к митотическому, а тип 3 — к мейотическому мозаицизму [570].

Данные, представленные в таблице 7.3, свидетельствуют о неравном участии разных хромосом в образовании плацентарного мозаицизма. Так, трисомные мозаики по хромосомам 1, 4, 6, 11, 14, 17 и 19 не зарегистрированы ни в одном исследовании. В то же время трисомии 7, 13 и 18 одинаково часто встречаются при том или ином варианте плацентарного мозаицизма. Для других хромосом наблюдается неслучайная ассоциация с типом плацентарного мозаицизма. Наиболее ярко она выражена для 4 пар хромосом — трисомия 16 во всех случаях затрагивает всю плаценту, трисомия 2 характерна для экстраэмбриональной мезенхимы, трисомия 3 и моносомия X — для цитотрофобласта. Для мозаицизма в цитотрофобласте наиболее частыми являются трисомии 3, 7, 13, 18, 20 и 21, тогда как трисомии 8, 9, 15 регистрируются редко. С мозаицизмом типа 2 обычно связаны трисомии 2, 7 и 18, а трисомии хромосом 5, 8, 9, 10, 12, 13, 21 и 22 для этого типа мозаицизма не характерны. С мозаицизмом типа 3 ассоциированы, в основном, трисомии

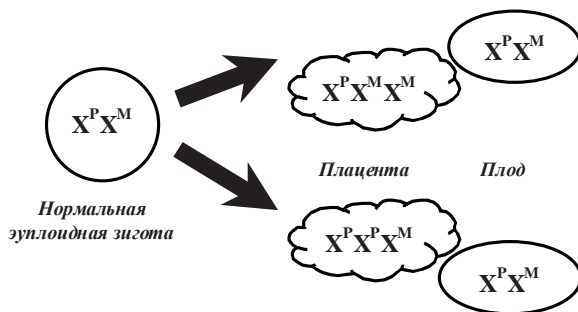


Рис. 7.6. Возникновение ограниченного плацентарного мозаицизма при дроблении нормальной эуплоидной зиготы

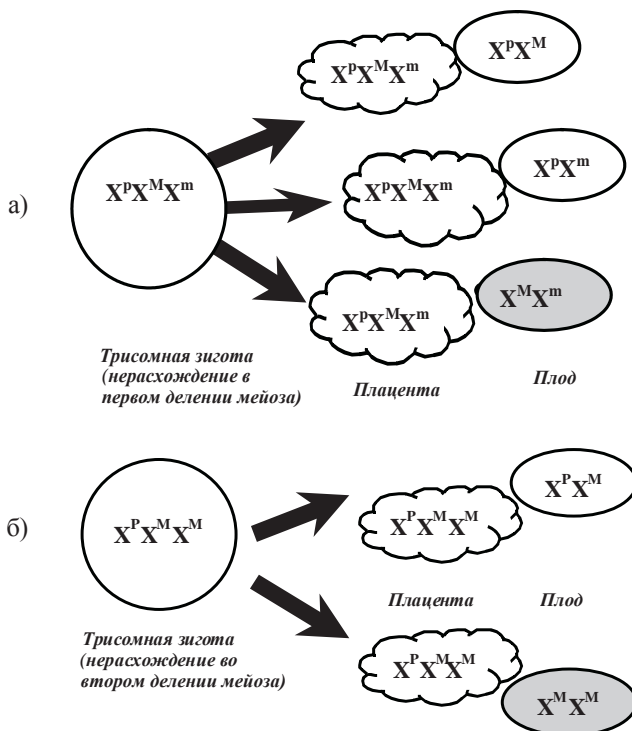


Рис. 7.7. Возникновение ограниченного плацентарного мозаицизма и однородительской дисомии при дроблении анеуплоидной зиготы в случае нерасхождения хромосом в первом (а) или во втором (б) делениях мейоза

Таблица 7.3. Участие хромосом в мозаицизме, ограниченном плацентой [570]

Тип мозаицизма	Хромосома																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
1			■				■	■	■				■		■			■		■	■			М
2		■			■		■	■	■	■		■	■					■		■	■	■		
3							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		

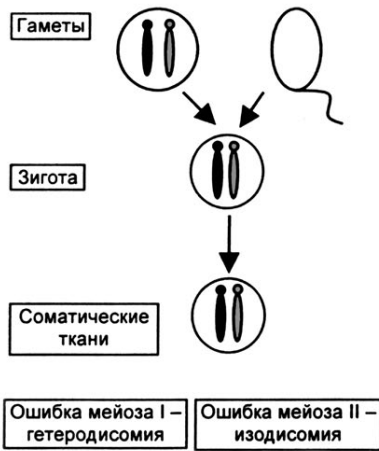
Примечания. Частота выявленных пренатально случаев трисомии: ■ $\geq 10\%$; ■ 3–10%; □ не выявлены.
М — моносомия.

15, 16, 18. Таким образом, тип мозаицизма в определенной степени детерминирован хромосомой, вовлеченной в нерасхождение [616].

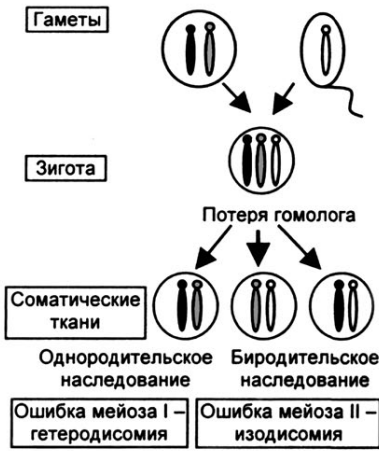
7.3. Однородительская дисомия

При мозаичных трисомиях по любой из хромосом, а также в половине случаев моносомии X, независимо от типа мозаицизма и доли анеуплоидных клеток, вторая клеточная линия всегда является диплоидной. Как уже отмечалось, мейотический плацентарный мозаицизм типа 3 сопровождается восстановлением диплоидного кариотипа у плода вследствие утраты хромосом из триады. Коррекция трисомии в 1/3 случаев может приводить к возникновению *однородительской дисомии* — ОРД (*uniparental disomy*, или *upd*), т. е. наличием в диплоидном хромосомном наборе двух гомологичных хромосом только от одного из родителей. Возможные механизмы образования ОРД представлены на рисунке 7.8. Следует отметить, что ОРД является результатом, по меньшей мере, двух последовательных независимых событий аномальных сегрегаций хромосом, происходящих в гаметогенезе и во время постзиготических митотических делений. Аналогично возникает ОРД и в случаях aberrаций хромосом, таких как изохромосомы или Робертсоновские транслокации [863].

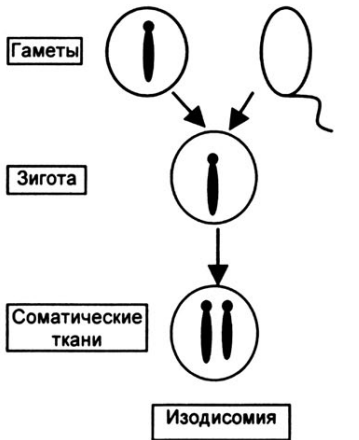
ОРД подразделяют на гетеро- и изодисомию. При гетеродисомии (нерасхождением хромосом в первом делении мейоза) (рис. 7.7, а; 7.8), в диплоидном наборе представлены оба гомолога от одного родителя. Изодисомия, т. е. удвоение одного из родительских гомологов, возникает вследствие нерасхождения хроматид во втором делении мейоза или дубликацией хромосомы при дроблении моносомной зиготы (рис. 7.7, б; 7.8).



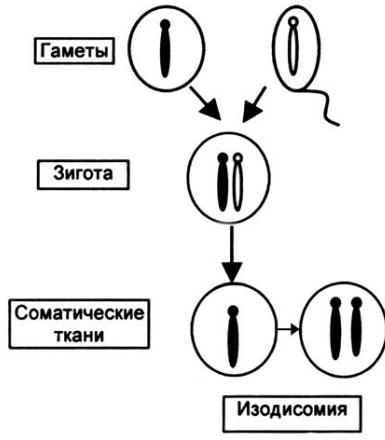
а) комплементация гамет



б) редукция трисомии



в) дупликация мейотической моносомии



г) дупликация митотической моносомии

Рис. 7.8. Механизмы формирования однородительской дисомии [121]

Крайним вариантом ОРД является *однородительская диплоидия*, т. е. утрата целого хромосомного набора отцовского или материнского происхождения. *Андрогения* (отсутствие материнского и удвоенный отцовский хромосомный набор) возникает в результате оплодотворения безъядерной яйцеклетки диплоидным спермием или дубликации генома гаплоидного спермия после оплодотворения. При андрогении собственно эмбрион и амнион не формируются, однако отмечается активное разрастание ворсинок хориона, гиперплазия трофобласта с отеком стромы и отсутствием капилляров. При дальнейшем развитии такого продукта зачатия, получившего название «полный пузырный занос», его клетки зачастую озлокачествляются, давая начало быстро метастазирующей опухоли — хорионэпителиоме.

Гиногения (удвоен материнский, отсутствует отцовский набор хромосом) — продукт партеногенетического развития овулировавшей неоплодотворенной яйцеклетки. Гиногения у человека ведет к дезорганизации плодного яйца, хаотичному росту эмбриональных тканей, образованию тератомы при недоразвитии или полном отсутствии оболочек плода.

Таким образом, аномальная сегрегация хромосом при дроблении зиготы и на более поздних стадиях эмбриогенеза приводит к мозаицизму. При этом мозаицизм независимо от происхождения может быть ограниченным (в одной ткани) или истинным (во всех тканях). Для объяснения механизмов возникновения мозаичных эмбрионов и мозаицизма, ограниченного плацентой, предложено несколько гипотез. Однако до сих пор не установлены факторы, способствующие нерасхождению хромосом при дроблении зиготы, а также не определен вклад каждого из возможных механизмов в формирование мозаичных особей, не выяснены особенности их эмбрионального развития.

7.4. Проблемы пренатальной диагностики мозаицизма

Современный уровень ультразвуковой техники позволяет получать материал плодного яйца с целью пренатальной диагностики на любых сроках беременности (см. главу 9). В настоящее время распространены трансабдоминальные способы получения

материала — аспирация ворсин хориона (плаценты), амниоцентез и кордоцентез. Для цитогенетического анализа в I триместре беременности используют препараты из клеток ворсинчатого хориона, во II и III триместрах материалом для исследования служат клетки плаценты, амниотической жидкости и лимфоциты крови плода (см. главу 9).

Особенности происхождения анализируемого материала, а также методы приготовления хромосомных препаратов имеют принципиальное значение для интерпретации результатов пренатальной диагностики. Напомним, что цитотрофобласт хориона, будучи производным трофэктодермы, а также мезодермальная строма ворсин хориона/плаценты обособляются от внутренней клеточной массы на стадии бластоцисты, т. е. имеют экстраэмбриональное происхождение (см. главу 1). Амнион, формирующийся из первичной эктодермы, а также все эпителиальные клетки амниотической жидкости и лимфоциты пуповинной крови являются эмбриональными структурами. Анализ хромосом в амниоцитах и лимфоцитах плода возможен лишь после культивирования клеток, тогда как митотически делящиеся клетки хориона (плаценты) могут быть получены на «прямых» препаратах, либо после культивирования. При этом «прямой» метод основан на анализе спонтанно делящихся клеток Лангханса (цитотрофобласта), а источником делящихся клеток в культуре хориона являются мезенхимальные клетки стромы ворсин.

Хромосомный мозаицизм, обнаруженный при анализе препаратов, приготовленных любым из перечисленных методов, может оказаться истинным или ограниченным клетками исследуемой ткани. Основной проблемой диагностики с использованием препаратов культивированных клеток является артефактный мозаицизм, т. е. мозаицизм, не отражающий хромосомную конституцию плода. Вероятность диагностических ошибок, вызванных контаминацией образца клетками материнского происхождения и их способностью к клонообразованию, составляет 0,16% при культивировании клеток амниотической жидкости и 0,4% при культивировании клеток хориона [749]. Способность к митотическим делениям и темпы пролиферации клеток разного происхождения и с разным кариотипом в условиях *in vitro* могут существенно варьировать [96]. *Псевдомозаицизм*, обусловленный особенностями роста клеток в культуре, возникает с частотой 0,6–1,0%. Псевдомозаицизм может относиться к одному из следующих трех ти-

пов: а) часть колонии клеток имеет аномальный кариотип; б) одна и та же хромосомная аномалия представлена во всех клетках одной колонии; в) клетки двух и более колоний в одном культуральном флаконе имеют хромосомную аномалию [749]. Очевидно, что соотношения диплоидных и анеуплоидных клеток в культурах могут значительно отличаться от реально существующих *in vivo*. Поэтому нам представляется, что доля анеуплоидных клеток, определенная на «прямых» препаратах, более объективно отражает частоту аномальной сегрегации хромосом *in vivo*. Более того, на «прямых» препаратах из отдельных ворсинок можно выяснить степень распространенности анеуплоидной линии, т. е. определить, ограничена она клетками одной ворсины, или представлена в разных ворсинах. При этом, однако, невозможно определить жизнеспособность анеуплоидных клеток, а локализацию анеуплоидных клеток в пределах всей плаценты можно установить лишь при исследовании последа. В специальных исследованиях с использованием метода FISH было доказано, что степень анеуплоидии в разных участках плаценты может заметно различаться [308, 844]. При анализе «прямых» хромосомных препаратов, а также полученных после культивирования, мозаицизм может остаться нераспознанным, так как аспирируется локальный участок хориона, который необязательно содержит клетки обоих клонов. Следовательно, при диагностике с использованием в качестве материала клеток плодных оболочек возможны как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты.

Как уже отмечалось, хромосомный мозаицизм, выявленный в тканях плаценты, как правило, представляет собой ограниченный плацентарный мозаицизм, который лишь в 10% случаев соответствует истинному кариотипу эмбриона. Несоответствие между кариотипами хориона и плода может быть заподозрено в случаях обнаружения летальных и сублетальных хромосомных аномалий в биоптатах хориона или плаценты, полученных от плода без пороков развития. Вероятность ошибочного диагноза при использовании биоптатов хориона (плаценты) существенно снижается при сочетании «прямого» метода с анализом культивированных клеток.

Однако во всех случаях мозаичного кариотипа в плаценте для установления его типа необходим анализ хромосомного набора самого плода, для чего производится цитогенетическое исследование лимфоцитов пуповинной крови, либо клеток амниотической жидкости. Та-

ким образом, окончательный диагноз ограниченного плацентарного мозаицизма устанавливается только после получения информации о кариотипе в клетках самого плода.

7.5. Влияние плацентарного мозаицизма на течение и исход беременности

Результаты большинства исследований дают основания предполагать, что ограниченный плацентарный мозаицизм может сопровождаться внутриутробной задержкой развития плода (ВЗРП) и быть причиной неблагоприятных исходов беременности. Высокий уровень плацентарного мозаицизма наблюдается у спонтанных абортусов и при неразвивающейся беременности [525]. Так, частота ограниченного плацентарного мозаицизма в материале спонтанных выкидышей может достигать 13%, то есть почти в 6 раз превышать этот показатель при прогрессирующей беременности [449]. По некоторым данным [308], 1,9% беременностей с ограниченным плацентарным мозаицизмом завершается спонтанным абортom до 28 недель. Общие потери при беременностях, сопровождающихся плацентарным мозаицизмом, составляют 16,7% по сравнению с 2,3% в популяции [525]. Отмечено, что плацентарный мозаицизм обнаруживается при пренатальном кариотипировании в группах высокого риска по рождению детей с хромосомной патологией, преимущественно у беременных с привычным невынашиванием в анамнезе [88].

Плацентарный мозаицизм выявляется примерно в 10% беременностей, осложненных внутриутробной задержкой развития плода [332]. При наличии ограниченного плацентой мозаицизма у 12,3% новорожденных отмечено снижение веса менее 10-го перцентиля [308]. С другой стороны, у доношенных детей с ВЗРП плацентарный мозаицизм идентифицируется в три раза чаще, чем у новорожденных, соответствующих сроку гестации [892].

Влияние хромосомного дисбаланса при плацентарном мозаицизме на развитие плода объясняют либо прямым неблагоприятным действием аномальных клеточных клонов на формирование и функции плаценты, либо однородительской дисомией у плода [529].

Течение и исход беременности могут зависеть от уровня мозаицизма в трофобласте, а также от локализации аномальных клеток в экстраэмбриональных тканях. Так, при низком уровне аномальных клеток

наличие нормальных клеточных линий в плаценте может «смягчить» их патологические эффекты настолько, что мозаицизм не имеет клинических проявлений [525]. Наоборот, в случаях мозаицизма хромосом с достаточно высокой долей анеуплоидных клеток в плаценте, как правило, наблюдаются осложнения беременности [789]. Однако, если анеуплоидия в цитотрофобласте (тип 1 мозаицизма) в 22 % случаев сопровождается спонтанными абортми, ВЗРП или антенатальной гибелью плода, то при мозаицизме в экстраэмбриональной мезодерме (тип 2) осложнения наблюдаются значительно реже [570]. Аномальные исходы беременности, а также ВЗРП, коррелируют с мейотическим происхождением плацентарной трисомии и типом 3 ограниченного плацентарного мозаицизма [616], обусловленными по большей части трисомией 16 [570].

По-видимому, в клинических проявлениях мозаицизма определенную роль играет специфика вовлеченных в анеуплоидию хромосом. Почти эксклюзивная связь трисомии 3 с цитотрофобластом и трисомии 2 с мезенхимой, обнаруживаемая как при прогрессирующей беременности, так и в материале спонтанных абортусов [449, 896], может указывать на тканеспецифичность анеуплоидии. В литературе описаны единичные случаи наличия клеточных клонов с трисомией 3 в экстраэмбриональной мезодерме и клеток с трисомией 2 в цитотрофобласте, что свидетельствует о несовместимости такого тканеспецифичного хромосомного дисбаланса с эмбриональным развитием. Можно предполагать, что именно эти хромосомы в большей степени, чем другие, вовлечены в обеспечение процессов жизнедеятельности плаценты. Возможно, что трисомия именно этих хромосом даже в условиях мозаицизма, ограниченного клетками плаценты, приводит к существенным нарушениям функций плаценты, что и является причиной спонтанных абортов.

Не исключено, что существенное влияние на течение беременности и состояние плода оказывает и родительская принадлежность хромосом, принимающих участие в мозаицизме. В этой связи особого внимания заслуживают случаи полного несоответствия (дискордантности) кариотипа соматических тканей плода кариотипу клеток плодных оболочек. Как уже отмечалось, в хорионе и у плода возможны различные сочетания эуплоидных и анеуплоидных клонов. Сочетание диплоидии в хорионе с анеуплоидией у плода встречается крайне редко, сопровождается серьезными осложнениями беременности и отмечено

при таких сублетальных анеуплоидиях как трисомии 13 и 18, а также моносомия X [533, 644]. В подавляющем большинстве случаев анеуплоидными остаются внезародышевые ткани. При этом ограниченный плацентарный мозаицизм 3-го типа примерно в 30% случаев должен сопровождаться однородительской дисомией у плода [532, 570]. Считается, что частота однородительской дисомии у плода составляет примерно 8/10 000 развивающихся беременностей [533].

Как правило, однородительская дисомия выявляется при обследовании пациентов с наследственными болезнями, для которых установлен эффект *импринтинга*, под которым понимают эпигенетические структурно-функциональные изменения, которые происходят в родительских хромосомах во время гаметогенеза и приводят к стойким различиям в экспрессии гомологичных генов [19, 20] (см. также главу 10).

Список хромосом, по которым известны случаи однородительской дисомии, достаточно велик, хотя в нем представлены не все хромосомы набора — 25 из 47. При этом эффект импринтинга четко установлен лишь для 5 пар хромосом (хромосомы 7, 10, 11, 14, 15), предполагается для хромосом 2 и 16 [743] и его отсутствие при однородительской дисомии показано для 14 других пар хромосом [566]. Наиболее изученными «болезнями импринтинга» являются синдромы Прадера–Вилли [upd(15)mat] и Ангельмана [upd(15)pat], синдром Беквита–Видемана [upd(11)pat] и синдром Сильвера–Рассела [upd(7)mat] [362]. Кроме того, известны случаи диабета у новорожденных при upd(6)pat [788], а также различное проявление upd(14) — при материнской дисомии отмечается преждевременное половое созревание [605], тогда как при отцовской — карликовость [786]. Описано также несколько случаев upd(7)pat/mat у пациентов с муковисцидозом — одним из наиболее распространенных моногенных заболеваний [566].

Таким образом, однородительская дисомия в постнатальном периоде может приводить к четко очерченным синдромам. Влияние однородительской гетеро- и изодисомии на плод и течение беременности пока мало изучено. Последнее объясняется не только трудностями цитогенетической диагностики плацентарного мозаицизма, но и нечеткими критериями для оценки этого влияния.

Так, для одних и тех же хромосом, наряду с нейтральным воздействием дисомии, известны случаи внутриутробной гибели плода при upd(4)mat [859], upd(14)mat [608] и upd(21)mat [767]. Показана корре-

ляция ВЗРП у плода с $\text{upd}(2)\text{mat}$ [607], $\text{upd}(16)\text{mat}$ [530] и $\text{upd}(20)\text{mat}$ [609]. Между тем, не выявлены значимые отклонения в развитии плода при $\text{upd}(15)$ [729], и обнаружены лишь незначительные лицевые дисморфии при $\text{upd}(7)$ [606].

Оценивая влияние однородительской дисомии на эмбриональное развитие человека, необходимо отметить, что в литературе отсутствуют сведения о случаях ОРД только в плаценте, а также ее наличии во всех тканях плодного пузыря. Более того, независимо от природы хромосомы и ее родительского происхождения, а также от типа дисомии (изо- или гетеродисомия), во всех исследованных случаях ОРД у плода сопровождалась наличием трисомных клонов в тканях плаценты. Это обстоятельство не позволяет дискриминировать повреждающий эффект собственно ОРД у плода от такового, обусловленного трисомией в плаценте. Следовательно, рассматривать ОРД у плода как изолированный фактор, неблагоприятно влияющий на развитие плода и течение беременности, по-видимому, преждевременно.

Нельзя не отметить также, что некоторые авторы [300] связывают плацентарный мозаицизм с повышенным риском внутриутробной гибели плода и не обнаруживают его связи с ВЗРП и такими осложнениями беременности как преэклампсия и преждевременные роды. Наряду с этим, сообщается об отсутствии значимого возрастания перинатальных потерь [322], а также какой-либо связи между акушерскими осложнениями и плацентарным мозаицизмом, в частности, по трисомии 8 [774], 12 [648] и половым хромосомам [896].

Следовательно, беременности с ограниченным плацентарным мозаицизмом могут протекать без осложнений и завершаться рождением нормальных жизнеспособных детей, не отличающихся по весу, гестационному возрасту и оценке по шкале АПГАР от детей контрольной группы.

Таким образом, влияние плацентарного мозаицизма на течение и исход беременности неоднозначно. Противоречивость литературных данных относительно влияния мозаичной плаценты на развитие плода отчасти объясняется различными клиническими критериями оценки состояния плода, а также гетерогенностью случаев мозаицизма. Очевидно, однако, что ограниченный плацентой мозаицизм далеко не единственная причина задержки развития плода и других осложнений беременности, и риск неблагоприятных перинатальных исходов зависит от многих факторов. Следует отметить, что в связи с проблемами

Таблица 7.4. Акушерские осложнения беременности при плацентарном мозаицизме [138]

№	Показания для пренатальной диагностики	Срок, нед.	Картиотип клеток хориона	Результаты биохимического скрининга		Угроза прерывания		Гестоз	Исход беременности	Срок родов, нед.	Новорожденный		Особенности плаценты
				АФП, МоМ	ХГЧ, МоМ	< 16, нед.	> 16, нед.				Вес, г	Рост, см	
1	Возраст	19	45,X [1]/46,XY [11]	0,9	4,0	+	+	-	Преждевременные роды	36	2650	47	Промежуточные незрелые ворсинки
2	Возраст	14	45,XY,-14,-21,+1(4;21) [3]/46,XY [17]	0,9	-	-	-	-	Срочные роды	37	3340	51	-
3	Возраст	16	48,XX,+7,-7[2]/46,XX [17]	1,5	0,9	-	-	-	Срочные роды	40	3950	55	-
4	Возраст	16	47,XX,+3[1]/46,XX [12]	0,9	0,5	-	+	-	Срочные роды	38	2880	49	Диссоциированное созревание
5	Возраст	17	47,XX,+8[1]/46,XX [5]	-	-	-	-	Нефропатия I ст.	Срочные роды	40	4350	53	-
6	Возраст	13	47,XY,+7[1]/46,XY [21]	-	-	-	+	-	Поздний самопроизвольный аборт	-	-	-	-
7	Рождение ребенка с Дауна в амниозе	10	48,XX,+9,+18[1]/ 47,XX,+9[3]/46,XX [21]	2,9	5,2	+	-	Отеки	Срочные роды	38	2800	48	Промежуточные незрелые ворсинки
8	Рождение ребенка с Дауна в амниозе	10	47,XX,+3[9]/46,XX [14]	0,8	1,0	-	-	Отеки	Срочные роды	38	3560	50	Диссоциированное созревание
9	Биохимические маркеры	19	47,XY,+mat[2]/46,XY [11]	0,9	2,8	-	+	-	Преждевременные роды	37	2770	46	Промежуточные незрелые ворсинки
10	Биохимические маркеры	18	47,XY,+10[1]/46,XY [27]	1,0	2,4	+	+	Нефропатия II ст.	Преждевременные роды	36	2400	44	Диссоциированное созревание
11	Рождение ребенка с МВПР в амниозе	12	47,XY,+7[1]/46,XY [31]	1,1	4,4	+	+	Нефропатия I ст.	Срочные роды	40	3850	53	-

диагностики, а также отсутствием четких прогностических критериев, в настоящее время не существует алгоритмов ведения беременности при ограниченном плацентарном мозаицизме.

С целью выработки оптимальной тактики ведения беременности нами проведен комплексный анализ течения и исходов беременности при наличии ограниченного плацентой хромосомного мозаицизма, выявленного в результате пренатальной диагностики [138]. Полученные данные свидетельствуют, что осложнения беременности практически не зависят от представительности аномальной клеточной линии и хромосомы, задействованной в ее образовании. Повышенный (≥ 2 МоМ) уровень ХГЧ в сыворотке крови матери, отмечающийся примерно в половине случаев плацентарного мозаицизма [714], может служить маркером недостаточной зрелости трофобласта [545], которая сохраняется до конца беременности и регистрируется при гистологическом исследовании плаценты (табл. 7.4). Считается, что персистенция промежуточных незрелых ворсин при сохранении их морфофункциональной активности возникает при раннем антенатальном повреждении (8–18 недель гестации). При этом основным патогенетическим механизмом нарушения является недостаточная инвазия трофобласта в миометральные сегменты спиральных артерий [110], которая может сопровождаться изменением кривых скоростей кровотока в маточных артериях [106]. Действительно, резистентность (ИП и СДО) в маточных артериях в срок 20 недель оказалась повышенной более чем в половине случаев и имела тенденцию к повышению на протяжении всей второй половины беременности. Полученные нами данные убедительно демонстрируют целесообразность углубленного динамического УЗИ состояния фетоплацентарной системы для ранней диагностики и профилактики акушерских осложнений при плацентарном мозаицизме.

7.6. Теоретические аспекты хромосомного мозаицизма

Проблема хромосомного мозаицизма представляет не только большое практическое значение, но и привлекает интерес как одна из интригующих проблем биологии развития. Достаточно отметить, что для зародышей человека доимплантационных стадий развития мозаицизм хромосом рассматривается как нормальное явление, а ОПМ, скорее, следует трактовать как исключение. Является ли мозаицизм, регистриру-

емый в клетках плаценты в период после имплантации следствием мозаицизма у зародышей на стадии морулы — бластоцисты или он возникает *de novo* в отдельных клетках — на этот вопрос пока нет ответа. Если часть анеуплоидных клеток первичного трофобласта сохраняет способность к митотическому делению и формирует частично анеуплоидный цитотрофобласт, то почему возникающая на более поздних стадиях эмбриогенеза внезародышевая мезодерма с такой же частотой образует анеуплоидные клоны? Одинаковы ли механизмы образования анеуплоидии при митотических делениях клеток цитотрофобласта и мезодермы? Почему в образовании анеуплоидии чаще вовлечены хромосомы, для которых не известны клинические синдромы, а скорее, те хромосомы, которые принимают участие в опухолевых процессах? Возможно ли, что хромосомный дисбаланс в плаценте отражает особенности этого органа как гормонозависимой опухоли? Имеют ли селективное преимущество в плаценте клоны с трисомией хромосом, несущие соответствующие онкогены или регуляторы генов-супрессоров онкогенеза? Не является ли плацента тем полигоном, на котором тестируется активность онкогенов и испытывается надежность генов-супрессоров? Если это так, то представляется любопытным выяснить, существует ли корреляция между ОПМ и онкологическими заболеваниями у детей, рожденных после таких беременностей. На наш взгляд, эксперименты на модельных объектах могли бы ответить на часть этих вопросов.

Заключение

Таким образом, влияние плацентарного мозаицизма на течение и исход беременности неоднозначно. Отчасти это объясняется различными клиническими критериями оценки состояния плода, а также цитогенетической гетерогенностью мозаицизма. Реальный вклад плацентарного мозаицизма в структуру перинатальной патологии до сих пор не определен. В связи с отсутствием четких прогностических критериев в настоящее время не существует алгоритмов ведения беременности при плацентарном мозаицизме. Углубленное исследование фетоплацентарного комплекса в условиях хромосомного мозаицизма будет способствовать повышению эффективности профилактики, ранней диагностики, лечения возможных осложнений и, в конечном итоге, снижению частоты перинатальной патологии.

Вклад мозаицизма хромосом в патологию постнатальных стадий развития человека оценить достаточно трудно в связи с невозможностью объективной оценки величины и распределения в организме клеточного клона с aberrантным кариотипом. Наиболее подробно изучено фенотипическое проявление хромосомного мозаицизма половых хромосом при синдроме Шерешевского–Тернера. Однако, несмотря на клиническую и цитогенетическую изученность синдрома Шерешевского–Тернера, следует признать, что особенности фенотипических проявлений полной или мозаичной форм хромосомного дисбаланса пока еще далеко не выяснены. До сих пор отсутствует единая схема лабораторно-генетического обследования пациенток, не унифицированы диагностические критерии оценки хромосомного мозаицизма при использовании молекулярных и молекулярно-генетических методов анализа, не установлены причины высокой частоты возникновения и сохранения в онтогенезе мозаичных форм моносомии X.

Однако по мере накопления и систематизации сведений о частоте истинного и ограниченного тканевого мозаицизма при хромосомных болезнях в целом и у пациенток с синдромом Шерешевского–Тернера, в частности, становится очевидным, что традиционные представления о частоте и фенотипических проявлениях мозаичных форм хромосомного дисбаланса в онтогенезе человека нуждаются в уточнении и пересмотре.

ГЛАВА 8

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОНОВ И ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА С ХРОМОСОМНЫМИ АНОМАЛИЯМИ

Введение

Анализ взаимоотношений генотип — фенотип на уровне отдельных генов, генных ансамблей и целых генных сообществ, которыми, по сути, и являются хромосомы, остается центральной проблемой современной генетики развития [84, 85]. Сегодня эта проблема приобретает особую актуальность в связи с полной расшифровкой первичной структуры генома человека [316] и началом планомерных исследований по функциональной геномике [79]. Неоднократные попытки изучения роли отдельных хромосом в эмбриогенезе млекопитающих предпринимались и раньше [11, 56, 380]. Благодаря достижениям в расшифровке генома человека, а также успехам нового научно-практического направления медицинской генетики — пренатальной диагностики — стал возможным углубленный комплексный анализ сложных взаимоотношений генотипа (кариотипа) и фенотипа и в развитии человека [12, 151].

Исследование влияния аномального хромосомного набора на морфологические и функциональные особенности развивающегося организма — традиционный подход в цитогенетике развития. Исторически первым направлением исследований в этой области можно считать клиническую цитогенетику, в задачи которой входит установление таких корреляций в постнатальном периоде жизни человека. Родоначальниками этого направления являются Чарльз Форд, Патриция Джекобс и Джером Лежен, которые в 50-е годы XX века обнаружили численные аномалии кариотипа у пациентов с распространенными хромосомными болезнями (синдромы Дауна, Шерешевского–Тернера, Клайнфельтера) [134, 187, 483].

По мере накопления сведений о множественных пороках развития у человека возникло и новое направление — синдромология [97]. Широкое использование в последние годы молекулярно-цитогенетических методов исследования, прежде всего, различных модификаций методов гибридизации *in situ*, позволило установить хромосомную природу многих наследственных синдромов, обусловленных микроперестройками хромосом, не улавливаемых обычными стандартными цитогенетическими методами (список наиболее распространенных из них приведен в главе 3). В отдельную группу выделены моногенные нозологические формы, сопровождающиеся нестабильностью числа и структуры хромосом [124].

8.1. Множественные врожденные пороки развития

Полувековой практикой клинической генетики и цитогенетики доказано, что для большинства хромосомных болезней, обусловленных численными или структурными аномалиями хромосом, характерны множественные врожденные пороки развития (**МВПР**). Если среди всех врожденных пороков на долю хромосомного дисбаланса приходится около 6% [534], то среди МВПР удельный вес хромосомных болезней может достигать 51% [181]. Именно поэтому цитогенетические исследования являются ведущими при выяснении причин МВПР.

Между тем МВПР могут быть следствием не только хромосомных, но и генных мутаций, а также результатом воздействия различных тератогенов, либо сочетанным эффектом этих факторов. Общепринятой классификации нехромосомных синдромов МВПР не существует, и при их описании используются различные подходы. Отечественные синдромологи выделяют несколько групп нехромосомных МВПР [28, 97].

- *Моногенные синдромы* — многочисленная группа (40% от всех нехромосомных синдромов), представленная как доминантными, так и аутосомно-рецессивными формами, в том числе X-сцепленными.
- *Синдромы с неуточненным типом наследования*, к которым могут относиться и мультифакториальные болезни с полигенным наследственным компонентом.

- *Синдромы, вызванные действием внешних факторов.* Так, около 5 % МВГР обусловлено внутриутробными инфекциями и заболеваниями матери [534].
- *Неклассифицированные комплексы МВГР* (сочетание пороков, не выделенных в синдромы), которые представляют отдельную группу нехромосомных синдромов.

Если при хромосомных синдромах для диагностики достаточно анализа кариотипа, то цитогенетические исследования при других формах МВГР лишь отвергают хромосомную природу данного комплекса пороков развития, но не позволяют точно установить диагноз. Что касается диагностики нехромосомных синдромов, то за последние десятилетия на биологических моделях лабораторных животных достигнут значительный прогресс в понимании структуры и функций генов, ответственных за изолированные пороки у человека [894]. Определенные надежды вселяют успехи в изучении на экспериментальных объектах семейств генов SOX, HOX, PAX, которые принимают участие в регуляции раннего эмбрионального развития у млекопитающих (см. главу 11).

Как известно, большинство врожденных пороков развития, в том числе и МВГР, являются следствием новых мутаций. Так, с мутациями *de novo* связано более 90 % случаев хромосомных синдромов и свыше 80 % синдромов с аутосомно-доминантным типом наследования [31]. При этом фенотипическая гетерогенность характерна для всех МВГР, независимо от их этиологической причины.

Следует иметь в виду, что в клинической генетике врачам приходится иметь дело с уже сформировавшимися пороками и синдромами, то есть с конечными фенотипическими эффектами геномных, хромосомных и генных мутаций. Естественно ожидать, что более полная информация о контроле процессов онтогенеза может быть получена при исследовании особенностей фенотипического проявления мутаций на более ранних стадиях развития человека, то есть еще до рождения.

Цитогенетические исследования в эмбриогенезе представляют большой интерес еще и потому, что многие хромосомные нарушения у человека, летальные на ранних стадиях, уже не встречаются в более поздние сроки и у новорожденных (см. главу 5). Предполагалось, что сравнительные цитогенетические и патоморфологические исследования позволят выяснить роль хромосомного дисбаланса не только

в эмбриональной гибели, но и в формировании врожденных пороков развития, как совместимых, так и несовместимых с жизнью.

70-е годы XX века были ознаменованы крупномасштабными исследованиями спонтанных абортусов человека. Патоморфологическому описанию были подвергнуты тысячи эмбрионов и зародышевых оболочек, у которых были выявлены практически все типы геномных мутаций и многие структурные хромосомные aberrации. Так, было показано, что хромосомный дисбаланс приводит к различным по характеру и выраженности патологическим изменениям — бласто-, эмбрио- и фетопатиям, которые проявляются на клеточном, тканевом и организменном уровнях [77, 91, 93]. Эти исследования сыграли важную роль в понимании специфичности и неспецифичности пороков развития, в формировании представлений о клеточном синдроме как патоморфологической основе хромосомных болезней [46, 47, 93, 96].

Вместе с тем, уже первые исследования спонтанных абортусов обнаружили безусловную ограниченность такого подхода, связанную с особенностями исследуемого материала. Главная трудность заключалась в дифференциации первичных нарушений морфогенеза от вторичных, посмертных изменений. Между тем такая дифференциация имеет принципиальное значение при определении стадии, на которой прекратилось развитие, и тех изменений, которые привели к этой остановке [47]. Аутолиз тканей абортусов создает также определенные трудности при культивировании клеток, полученных из абортивного материала [93]. Успешное кариотипирование обычными методами возможно только у 46% спонтанных абортусов. Установить кариотип у остальных можно только на интерфазных клетках с использованием молекулярно-цитогенетических методов анализа [100]. Естественно, что по своей точности «интерфазная» цитогенетика значительно уступает стандартному метафазному анализу.

Реальные возможности прижизненного изучения эмбрионов человека с хромосомными aberrациями появились только с разработкой методов исследования плода с помощью ультразвукового сканирования в сочетании с их кариотипированием на образцах материала, полученных на разных стадиях внутриутробного развития.

За последнее десятилетие ультразвуковые исследования стали неотъемлемой частью обследования плода. Ультразвуковая диагностика применяется как в качестве рутинного клинического метода опреде-

ления сроков беременности и жизнеспособности плода, так и для выявления различных аномалий развития. Следует отметить, что изначально УЗИ с целью выявления пороков развития у плода применяли, главным образом, во II триместре беременности [879].

В настоящее время разрешающая способность ультразвуковых приборов и большой опыт многих тысяч УЗ-исследований позволяет подробно анализировать фенотипические особенности плода и в I триместре беременности [152, 178].

Такие исследования очень быстро привели к формированию представлений об ультразвуковых маркерах хромосомных болезней (sonogram indicators). Термин *УЗ-маркеры* используется для обозначения отклонений биометрических параметров и анатомических структур, позволяющих предполагать наличие хромосомной болезни у плода [749]. Изначально к таким ультразвуковым маркерам (УЗМ) относили синдром ВЗРП, некоторые аномалии скелета и лицевого черепа. По мере накопления знаний и совершенствования техники число УЗМ, рекомендуемых для скрининговых УЗИ, постоянно пополняется. При этом прогностическая значимость для диагностики хромосомной патологии у плода каждого из УЗМ различна и зависит от срока беременности. Однако, если спектр выявляемых аномалий во втором триместре достаточно велик, то основными УЗМ хромосомных болезней у плода с 10-й по 14-ю недели беременности являются толщина воротникового пространства (ТВП) и состояние оссификации носовых костей, толщина и число сосудов пуповины, размеры нижней челюсти. Увеличение ТВП является ультразвуковым маркером не только хромосомных болезней, но и таких достаточно частых аномалий как пороки сердца и магистральных сосудов, лимфатической и мочевыделительной систем и некоторых других [133, 152].

Дальнейшее совершенствование УЗ-техники (цветное сканирование, доплерометрия, трехмерное изображение и пр.) значительно увеличивает возможности детального прижизненного анализа анатомии плода практически на любой стадии развития и даже позволяет получить ценную информацию о состоянии и функциях некоторых органов и систем плода в развитии. Не случайно на сегодняшний день именно ультразвуковое исследование является наиболее эффективным методом изучения фенотипа плода в норме и при патологии.

Вполне закономерна, хотя реально весьма уязвима, наметившаяся в последние годы тенденция постановки диагноза конкретного наследственного синдрома исключительно по результатам УЗИ [40, 152, 178]. Действительно, некоторые пороки развития органов и систем и/или транзиторные состояния, не соответствующие сроку развития, чаще встречаются у плодов с определенными хромосомными болезнями. Однако строгой специфичности УЗМ по отношению к хромосомной патологии у плода вообще и, тем более, патогномичных для определенных хромосомных синдромов не выявлено. Синдромологический подход в УЗ-диагностике, равно как и в клинической генетике и патологической анатомии, позволяет зарегистрировать аномалию развития, в первую очередь — изолированные и множественные пороки, и с той или иной вероятностью заподозрить наличие хромосомной патологии. Очевидно, что постановка диагноза хромосомной патологии у плода реально возможна только путем его кариотипирования. Кроме того, следует учитывать, что у многих плодов с хромосомным дисбалансом пороки развития отсутствуют, а фенотипические признаки столь невыразительны, что вполне могут оказаться не зарегистрированными в качестве УЗМ. Наконец, разграничение эхографических признаков на ВПР и УЗМ хромосомных болезней, учитывая транзиторный характер не только многих УЗМ, но и некоторых пороков развития, коррекция которых осуществляется за счет компенсаторных механизмов в процессе дальнейшего внутриутробного развития, также неубедительно. На наш взгляд, термин *УЗМ хромосомных болезней* может быть использован применительно к любым отклонениям в развитии, в том числе и порокам, независимо от степени их тяжести. Исключениями из этого правила являются лишь некоторые, в основном, изолированные пороки развития (например, анэнцефалия или дефекты зарощения нервной трубки), при которых хромосомные нарушения у плода являются случайными находками. Это утверждение отнюдь не противоречит факту существования пороков развития, включая МВПР, хромосомной и генной этиологии. Анализ мутаций в генах-регуляторах эмбрионального развития, роль которых в возникновении ВПР доказана на модельных объектах, обсуждается в качестве перспективного направления профилактики врожденной и наследственной патологии (см. главы 9 и 11). Следовательно, кариотипирование является способом дифференциальной диагностики хромосомных и нехромосомных ВПР.

Таким образом, существующие представления об аномалиях эмбрионального развития плодов с хромосомным дисбалансом основаны на информации, полученной преимущественно при изучении спонтанных абортусов или новорожденных с МВПР. Инвазивные методы позволяют провести пренатальное кариотипирование практически на любом сроке беременности (см. главу 9). При помощи УЗ-сканирования, ставшего неотъемлемой частью комплексных исследований состояния плода человека в рамках пренатальной диагностики, могут быть получены сведения об анатомических и функциональных особенностях развивающегося плода. Прижизненные особенности развития, дополненные патоморфологическими исследованиями абортного материала, который не подвергся аутолизу, помогают воссоздать картину фенотипического проявления хромосомного дисбаланса на разных сроках развития. Между тем, данные УЗ- и патоморфологического исследований, как правило, разрозненны, нередко противоречивы. Учитывая эти обстоятельства, очевидно, что полная информация может быть получена при тесном союзе специалистов по клинической генетике, ультразвуковой диагностике, патологической анатомии и физиологии. Возможно, такой альянс окажется продуктивным для решения целого ряда актуальных задач генетики развития. Так, до сих пор дискуссионным остается патогенез многих ВПР, не изучена динамика их формирования. Неясными остаются генез сочетанных пороков при возникновении достаточно устойчивых комплексов МВПР, их роль в реализации хромосомных эмбриолетелей, в том числе крайне низкой жизнеспособности плодов с полным или мозаичным вариантом синдрома Шерешевского–Тернера и т. д.

Следует отметить, что такой комплексный анализ, включающий прижизненное фенотипирование плодов с хромосомными аномалиями, позволяет получить новую информацию, важную как для фундаментальной науки, так и для практической медицины. С одной стороны, выяснение взаимосвязи между дисбалансом отдельных хромосом или их сегментов и отклонениями в развитии плода способствует пониманию роли структурных и регуляторных генов в процессах раннего онтогенеза человека. С другой — выявление пороков или УЗМ у плода после кариотипирования позволяет оценить информативность изолированных и сочетанных УЗМ в качестве маркеров хромосомной патологии, что способствует повышению эффективности пренатальной диагностики.

Рассмотрение принципов патоморфологического анализа с целью точной диагностики ВПР выходит за рамки настоящей главы. Мы не касаемся также возможностей и эффективности ультразвуковой диагностики, подробно рассмотренных в специальной литературе [40, 133, 152, 153, 178]. Отметим, однако, что не только срок беременности и уровень УЗ-обследования, но и квалификация врача УЗД существенно влияют на частоту и характер выявленных фенотипических признаков (маркеров), а знание эмбриологии человека и основ медицинской генетики — на своевременность и эффективность инвазивной пренатальной диагностики хромосомных болезней, более детально рассмотренной в главе 9.

8.2. Хромосомные аномалии как ранние эмбриональные летали

Как уже рассмотрено в главе 5, частота спонтанных хромосомных и геномных мутаций в эмбриогенезе человека коррелирует со сроком беременности, т. е. чем раньше прерывается беременность, тем чаще встречаются абортусы с хромосомными аномалиями. Частота хромосомных нарушений (4–60%) максимальна на доимплантационных стадиях. Она снижается во время имплантации и начала активного органогенеза в среднем до 8–10% (к 8–10-й неделе беременности) и составляет около 5% во II триместре. При рождении хромосомные аберрации встречаются сравнительно редко и регистрируются примерно у 0,5–0,9% всех новорожденных.

В целом, структура хромосомной патологии при репродуктивных потерях стабильна, а спектр хромосомных аномалий у спонтанных абортусов существенно отличается от такового у новорожденных. Эти обобщенные данные убедительно доказывают, что многие хромосомные нарушения, приводящие к дисбалансу сотен генов даже одной хромосомы, независимо от ее размеров, как правило, летальны на ранних сроках беременности и несовместимы с постнатальным развитием.

Вместе с тем, как и у других млекопитающих, различные типы хромосомных нарушений у человека проявляются по-разному. К числу наиболее ранних эмбриолеталей у человека, безусловно, относятся моносомии практически всех аутосом и некоторые типы трисомий (например, трисомии 16, 15 и 22). Используя метод сравнительной геномной гибридизации (CGH), было показано, что для ранних спонтанных

абортов с признаками анэмбрионии (отсутствие в плодном яйце частей самого эмбриона) характерны трисомии 1, 2, 19, 15 [139].

Любопытно отметить, что и при трисомиях других хромосом, а также при моносомии X, которые в принципе совместимы с завершением эмбриогенеза и с живорождением, значительная часть плодов (до 99% в случае кариотипа 45,X, 30–70% при трисомиях 13, 18 и 21) погибает еще в антенатальном периоде. Согласно мировым сводкам, в период от 10-й недели беременности до родов элиминируется примерно половина плодов с трисомией 21 (синдром Дауна), более 80% с трисомией 18 (синдром Эдвардса), более 60% с трисомией 13 (синдром Патау) и около 30% плодов с моносомией X (синдром Шерешевского–Тернера) [178].

Начиная с 70-х годов XX века предпринимались неоднократные попытки определить причину сублетальных аномалий кариотипа. Однако и в настоящее время нарушения развития собственно эмбриона [60], а также процессов имплантации и плацентации [116, 733], регулярно регистрируемые при патоморфологических исследованиях, не могут объяснить многообразие фенотипических проявлений и эмбриональной гибели при дисбалансе одной и той же хромосомы.

Предполагается, что на жизнеспособность плода оказывает влияние форма хромосомного дисбаланса. В частности, выдвинута гипотеза, что антенатальной гибели менее подвержены плоды с мозаичным кариотипом или имеющие хромосомный мозаицизм в плаценте [479, 644]. Косвенным подтверждением «сохраняющего» беременность влияния мозаицизма, по крайней мере, при моносомии X, является факт повышенной частоты мозаиков X/XX и X/XY среди новорожденных по сравнению с таковой среди спонтанных абортусов [649]. Вместе с тем, мозаичная форма гетероплоидии, представленная только в плаценте (ограниченный плацентой мозаицизм), может быть причиной самопроизвольного прерывания беременности (см. раздел 7.5).

При обсуждении проблемы о вкладе хромосомной патологии в репродуктивные потери, следует напомнить, что невынашивание беременности продолжает оставаться одной из центральных проблем в акушерстве и репродуктологии. Однако до сих пор не выработано единого мнения относительно применимости термина «привычное невынашивание» к сроку беременности. Так, некоторые авторы считают, что привычное невынашивание — это наличие двух и более спонтанных выкидышей в I триместре [630]. Другие распространяют этот тер-

мин на самопроизвольное прерывание беременности до 16-й недели беременности [173]. В качестве причин невынашивания беременности рассматривают инфекции, нарушения эндокринной системы, иммунный статус, анатомические особенности женского организма и многие другие факторы. При этом доля привычного невынашивания неясной этиологии в этой структуре составляет не менее 50%.

Одной из ведущих причин привычного невынашивания принято считать генетический фактор, под которым в настоящее время понимают, как правило, спонтанное прерывание беременности плодом с хромосомными нарушениями. Действительно, хромосомным аномалиям принадлежит важное место в этиологии спонтанного прерывания беременности. Между тем, хромосомным дисбалансом не исчерпывается проблема репродуктивных потерь, тем более что во многих случаях кариотип абортуса остается неизвестным или оказывается нормальным. В последнее время большое внимание уделяется изучению роли генов «предрасположенности» к невынашиванию. Особый интерес в этом плане представляют гены детоксикации — глутатион- и N-ацетилтрансферазы (GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2), гены главного локуса гистосовместимости HLA, мембранные антигены групп крови A и B, гены мембранных рецепторов клеточного узнавания — интегрины, Ig (GPIIIa, GPIIb), а также гены фолатного цикла (MTHFR, MRR) [10]. Не исключено, что некоторые аллельные варианты этих генов способствуют невынашиванию, в том числе и самопроизвольному прерыванию беременности плодом с хромосомным дисбалансом. Следовательно, для выяснения причин привычного невынашивания, кроме кариотипирования спонтанного абортуса, необходимо углубленное комплексное обследование, включающее исследование кариотипов обоих супругов, анализ носительства инфекций, выяснение эндокринного статуса, а также особенностей аллельных вариантов генов предрасположенности.

Таким образом, моносомия любой из аутосом летальна уже на самых ранних стадиях эмбрионального развития человека. Дисбаланс некоторых хромосом совместим с завершением внутриутробного развития и живорождением, однако большинство зародышей человека с патологией кариотипа нежизнеспособны и подвергаются селекции еще во внутриутробном периоде. Причины столь многообразного проявления дисбаланса одной и той же хромосомы остаются одной из нерешенных загадок цитогенетики развития человека.

8.3. Фенотипические проявления хромосомных аномалий в I триместре беременности

Подавляющее большинство изолированных или множественных анатомических пороков (*эмбриопатии*), регистрируемых на поздних сроках внутриутробного развития или после рождения, возникает именно в период закладки зачатков органов и их формирования. Однако исследование эмбриона как *in vivo* (прижизненные наблюдения при УЗ-сканировании), так и *in vitro* (патоморфологический анализ) в ранние сроки беременности вследствие его малых размеров представляет значительные трудности.

Так, в 4–6 недель акушерского срока беременности при ультразвуковом исследовании в матке визуализируется лишь плодное яйцо диаметром 2–4 мм. Через 1–2 недели в плодном яйце диаметром 5–7 мм, окруженном экзогенным венчиком с нечеткими контурами (трофобластом), визуализируется эмбрион в виде высокоэхогенной линейной структуры длиной около 3 мм. В эти же сроки или несколькими днями позже по частоте сердечных сокращений определяется сердечная деятельность [175].

При дальнейшем развитии возможна детальная визуализация структур плода, анализ их размеров, топографии и формы.

Реально оценку основных структур головного мозга с помощью трансвагинальной эхографии можно проводить с 7 недель беременности (копчик-теменной размер эмбриона 9–14 мм). Идентификация интракардиальных структур и главных артерий возможна только с 11 недель беременности, при этом изображение 4-камерного сердца удается получить только в 12–13 недель, а сердечных артерий — после 13 недель. С помощью цветного доплеровского картирования можно не только оценить размеры желудочков сердца и диаметр сосудов, но и провести анализ показателей кровотока через атриовентрикулярные клапаны и клапаны главных артерий. Желудок определяется в брюшной полости эмбриона с 8–9 недель, но отчетливое изображение в виде анэхогенного округлого образования достигается с 10 недель. Средние размеры желудка в поперечном сечении изменяются от 1,2 мм в 9 недель до 2,4 мм в 12 недель. Кишечник в виде образования повышенной эхогенности по сравнению с другими абдоминальными структурами визуализируется с 12 недель, после втягивания петель в брюшную

полость. Почки плода, которые визуализируются с 10–12 недель, по мере увеличения в размерах теряют изначально высокую эхогенность. Мочевой пузырь, наблюдаемый в эти же сроки, напротив, характеризуется анэхогенностью. Конечности идентифицируются с 8 недель беременности, тогда как кости конечностей — после появления в них точек окостенения (бедренные и плечевые с 9 недель, голени и предплечья — с 10, а кисти и стопы — с 11 недель). Начиная с 11 недель можно оценить число пальцев [152].

Таким образом, ограниченные возможности УЗИ эмбриональных структур в I триместре беременности определяются малыми размерами зародыша и его бурным развитием в период активного органогенеза. Основными параметрами, внесенными в стандартный протокол скринингового исследования в I триместре, являются копчиково-теменной размер (**КТР**), диаметр желточного мешка и толщина воротничкового пространства. Однако оценка таких анатомических образований и органов плода как кости конечностей и свода черепа, сосудистые сплетения желудочков головного мозга (бабочка), позвоночник, желудок, передняя брюшная стенка и мочевой пузырь вполне реальна и рекомендована в качестве обязательной при УЗИ в I триместре [133].

Постоянно меняющаяся в ранние сроки беременности эхографическая картина в большинстве случаев позволяет лишь заподозрить пороки развития отдельных органов, но не проводить их диагностику. Например, изменения структур и сосудов сердца наряду с показателями скоростей кровотока могут служить ранними маркерами пороков сердца, скопление жидкости в желудке — указывать на возможные аномалии развития кишечного тракта (атрезию пищевода и двенадцатиперстной кишки). Атрезия двенадцатиперстной кишки диагностируется на основании выявления характерного признака «двойного пузыря» («double bubble») начиная с 14-й недели развития (рис. 8.1). Кишечная грыжа размером 5–10 мм, которая является нормальным вариантом развития в 7–10 недель, в более поздние сроки может реализоваться в омфалоцеле, содержащем некоторые или все внутренние органы плода (рис. 8.2), и сопровождаться незаращением передней брюшной стенки. Превышение продольного размера мочевого пузыря (≥ 8 мм по сравнению с 6 мм в 10–14 недель) является критерием при оценке мегацистика [152]. Укорочение длины трубчатых костей может указывать на замедление



Рис. 8.1. «Двойной пузырь» при атрезии двенадцатиперстной кишки у плода с трисомией 21. Беременность 14 недель. Эхограмма любезно предоставлена А. В. Михайловым



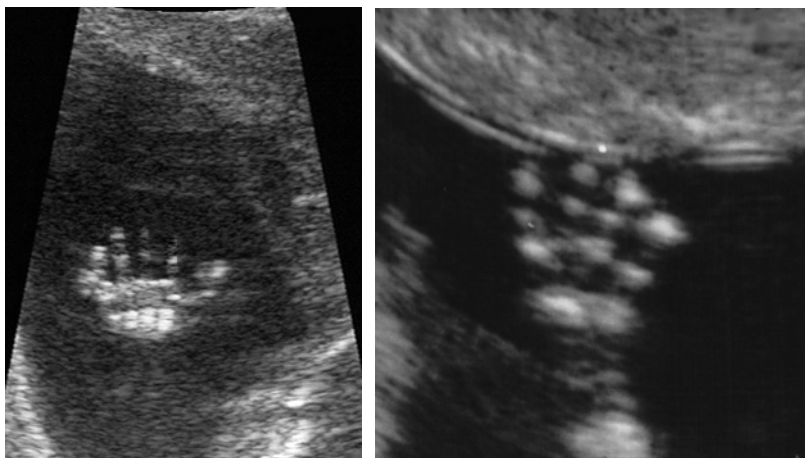
Рис. 8.2. Омфалоцеле, содержащее печень и петли кишечника, у плода с трисомией 18. Беременность 11 недель. Эхограмма любезно предоставлена В. М. Лебедевым

темпов развития плода и задержку процессов оссификации, а аномалии кистей (рис. 8.3) и стоп (рис. 8.4) — служить признаком целого ряда синдромов или относиться к незначительным дефектам, легко корригируемым после рождения.

Таким образом, практически любые эхографические отклонения, выходящие за пределы нормальной вариабельности, по сути, являются ультразвуковыми маркерами патологии развития плода, в т. ч. и хромосомной этиологии, и служат для формирования групп, нуждающихся в дополнительном обследовании, включающем комплекс методов пренатальной диагностики.

Представляется целесообразным рассмотреть некоторые особенности развития плода в I триместре беременности, которые в настоящее время рассматриваются как УЗМ хромосомной патологии.

Одним из ведущих эхографических признаков патологии плода, характерных для I триместра, признана расширенная гипозоженная зона в области шеи плода, обозначаемая как воротниковое пространство. Толщина воротникового пространства — область между внутренней поверхностью кожи плода и наружной поверхностью мягких тканей, покрывающих шейный отдел позвоночника. По мере развития в 10–14 недель размеры ТВП меняются незначительно и не выходят за пределы 2,5 мм. Увеличение ТВП (рис. 8.5), оцениваемое с использованием процентильных кривых, является критерием, позволяющим формиро-



а)

б)



в)

Рис. 8.3. Аномалии кистей у плодов с хромосомными болезнями: а — полидактилия у плода с трисомией 13 в 14 недель беременности; б — отсутствие средней фаланги V пальца у плода с трисомией 21 в 13 недель беременности; в — клинодактилия и скрещенные II и III пальцы у плода с трисомией 18 в 14 недель беременности. Эхограммы любезно предоставлены Д. В. Ворониным (а), Е. С. Некрасовой (б) и Г. К. Парцалисом (в)

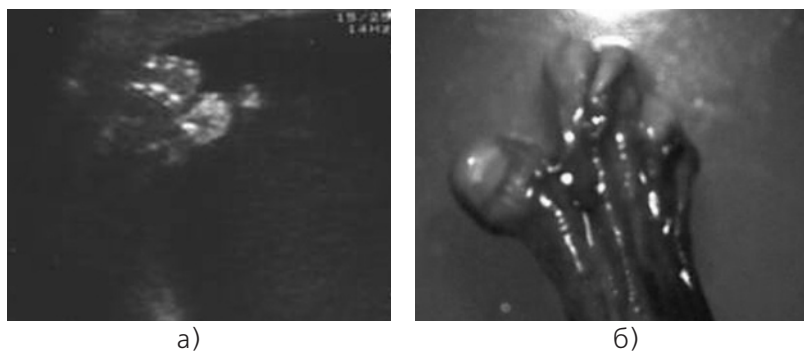


Рис. 8.4. Аномалии стоп у плода с кариотипом 69,XXX: косолапость, сандалевидная стопа, синдактилия. Беременность 14 недель: а — эхограмма (любезно предоставлена В. М. Лебедевым); б — анатомический препарат

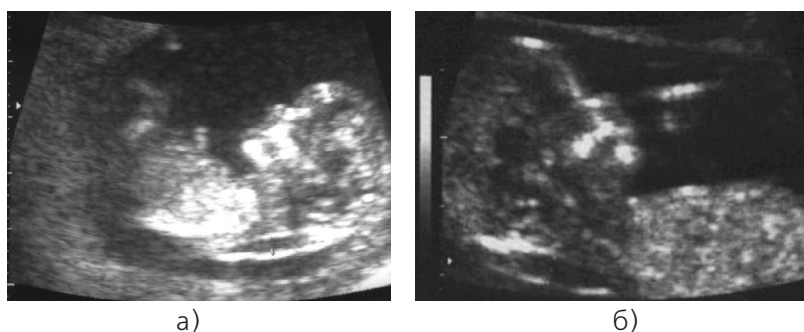


Рис. 8.5. Увеличение толщины воротникового пространства у плодов в 12 недель беременности. ТВП = 2,6 мм у плода с нормальным кариотипом (а) и ТВП = 3,6 мм у плода с трисомией 21 (б). Эхограммы любезно предоставлены Ю. А. Николаевой (а) и Е. С. Некрасовой (б)

вать группу риска по рождению детей с хромосомными болезнями и врожденными пороками развития.

Следует отметить, что частота плодов с увеличенным ТВП варьирует в широком диапазоне (0,41–6,4%) от всех УЗ-исследований в I триместре, что объясняется, в основном, погрешностями в измерениях [152].

К настоящему времени установлено, что увеличение ТВП в сроки от 10-й до 14-й недели беременности является общим фенотипическим признаком различных типов трисомий, в частности, 13, 18 и 21, а также моносомии X и триплоидии (табл. 8.1). Согласно обобщенным дан-

ным [152], около 30% плодов с увеличенной ТВП имеют хромосомные аномалии. Этот признак наиболее часто отмечается при трисомии 21 (50% всех случаев) и значительно реже встречается при трисомии 18 (23,9%), моносомии X (9,9%) и трисомии 13 (4,9%). В 10,8% случаев регистрируются другие аномалии кариотипа.

В настоящее время не подвергается сомнению ассоциация ТВП с пороками сердца. Как известно, врожденные пороки сердца — наиболее частый признак многих хромосомных болезней. Неслучайно поэтому в качестве косвенного критерия отбора в группу риска хромосомной патологии у плода при УЗИ используется частота сердечных сокращений [133]. Весомым дополнительным ультразвуковым маркером пороков сердца в конце I триместра является аномальный кровоток в венозном протоке в фазе сокращения предсердий [374]. Нормализация кровотока после 14-й недели беременности требует регламентации сроков проведения доплерометрии для диагностики пороков сердца. Следует подчеркнуть, что в отличие от стандартных УЗ-исследований, вопрос о безопасности для плода массовых доплерометрических исследований в I триместре пока окончательно не решен.

Не выяснены до настоящего времени и патогенетические механизмы увеличения ТВП, вызывающие чрезмерное накопление жидкости в воротниковой зоне и коррелирующие с аномалиями кровотока в венозном протоке и пороками сердца. Патологоанатомические исследования сердца у эмбрионов с трисомией 21 позволили предположить, что расширение восходящего участка дуги аорты и одновременное сужение ее перешейка могут привести к усилению кровотока в верхней половине туловища плода, а в случае нарушения венозного оттока крови при сердечной недостаточности у плода — к увеличению ТВП [491]. Дальнейшие исследования показали, что к увеличению ТВП может приводить уменьшение диаметра любого сегмента аорты [115]. Особенно наглядно этот вывод иллюстрировали результаты морфологических исследований сердца при моносомии X — у всех 25 эмбрионов были обнаружены нарушения формирования восходящей части и/или дуги аорты. Наиболее специфичным для этого синдрома пороком оказалась гипоплазия дуги аорты на участке между левыми (сонной и подключичной) артериями, которая, как правило, сопровождалась значительным увеличением ТВП — от кистозной гигромы шеи до генерализованного отека плода [115]. На выраженную взаимосвязь

между дефектами левых отделов сердца (гипоплазия и коарктация аорты) обращали внимание и другие исследователи [491].

Обсуждая проблему пороков сердца при хромосомных болезнях, следует отметить специфичность их спектра для определенных типов трисомий. Так, дефекты межжелудочковой перегородки (ДМЖП) и/или атриоventрикулярная коммуникация (АВК) более характерны для трисомии 21, ДМЖП в сочетании с аномалиями клапанов — для трисомии 18, а тетрада Фалло — для трисомии 13 [181]. Структура пороков у эмбрионов I триместра соответствует таковой у новорожденных с тем же типом трисомии, что свидетельствует о селективной нейтральности определенных пороков сердца во внутриутробной гибели [115]. Исключение составляет патология дуги аорты, которая у большинства новорожденных с пороками сердца, в том числе и при хромосомных болезнях, отсутствует. Возможно, что часть плодов с такой аномалией элиминируется. Предполагается также, что сужение отдельных сегментов аорты исчезает вследствие дифференциального роста магистральных сосудов [491]. Определенную роль в компенсации нарушений гемодинамики, обусловленной стенозом аорты, может играть ДМЖП [115]. Так, отмечено, что если патология дуги аорты коррелирует с увеличением ТВП (т. е. чем больше значение ТВП, тем чаще регистрируются изменения аорты), то частота ДМЖП находится в обратной зависимости от толщины ТВП. Предполагается, что общим патофизиологическим механизмом, ведущим к возникновению пороков сердца, аномальному формированию яремных лимфатических мешков и увеличению ТВП, является аномальное развитие эндотелия [279]. Тяжелая степень этих нарушений представлена почти у всех эмбрионов и плодов с кариотипом 45,X, а лимфатические отеки и дефекты левых отделов сердца, включая коарктацию аорты, регистрируются примерно у половины новорожденных с синдромом Шерешевского–Тернера [125]. Возможно, что механизмы компенсации сосудистой патологии в этих случаях менее эффективны, чем при аутомсомных трисомиях, что и является причиной массовой гибели зародышей с моносомией X.

Характерная для синдрома Шерешевского–Тернера кистозная гигрома шеи (рис. 8.6, а) относится к порокам развития лимфатической системы. УЗД этой аномалии основывается на выявлении двухсторонних с перегородками образований в шейной области. Достаточно часто (40–100%) шейная гигрома сочетается с пороками сердца и водянкой

плода (рис. 8.6, б, в) [178]. В отличие от других пороков, даже при изолированной гигроме обнаруживается высокая частота хромосомных аномалий (табл. 8.1).

Визуализация структур лица принципиально возможна с 11–12 недель беременности. Достаточно просто выявляемыми являются редкие аномалии, выраженные при голопрозэнцефалии (циклопия, пробосцис) [152]. Диагностика расщелин челюсти и неба (рис. 8.7) удается значительно реже и, в основном, при сочетании этих дефектов лицевого черепа с деформацией носа.

В последние годы при УЗИ лицевых структур в I триместре особое внимание уделяется оценке состояния носовых костей и размерам

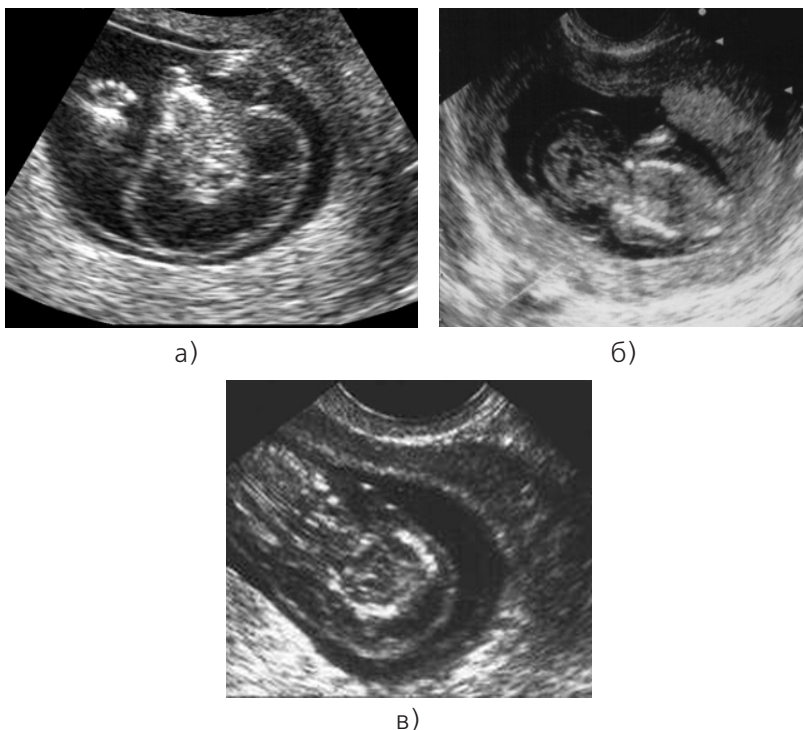


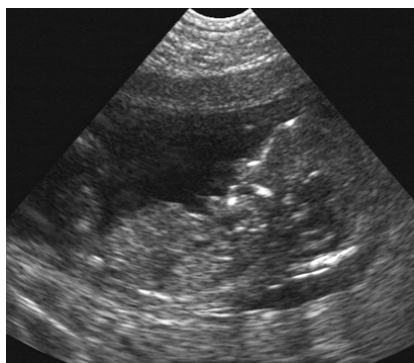
Рис. 8.6. Кистозная шейная гигрома у плода в 11 недель беременности (а). Шейная гигрома и отек мягких тканей головы плода с кариотипом 45,X. Беременность 12 недель (б). Генерализованный отек плода при трисомии 18 (в). Беременность 12 недель. Эхограммы любезно предоставлены Д. В. Ворониным (а), Е. С. Некрасовой (б) и В. М. Лебедевым (в)

Таблица 8.1. Результаты пренатального кариотипирования у плодов с ультразвуковыми маркерами хромосомной патологии и пороками развития, выявленными в I триместре беременности

УЗМ и ВПР	Всего диагностик	Нормальный кариотип	Аномалии кариотипа					
			+21	+18	+13	45,X	3n	Другие
Увеличение толщины воротникового пространства > 2,5 мм	91	59	11	9	3	2	2	5
Шейная гиргома	11	2	2	–	1	6	–	–
Отсутствие визуализации носовой кости	4	1	1	2	–	–	–	–
Омфалоцеле	2	1	–	1	–	–	–	–
Энцефалоцеле	1	1	–	–	–	–	–	–
Расщелины лица	2	1	–	1	–	–	–	–
Spina bifida	1	1	–	–	–	–	–	–
Иниэнцефалия	1	1	–	–	–	–	–	–
Гастрошизис	2	2	–	–	–	–	–	–
Крестцово-копчиковая тератома	1	1	–	–	–	–	–	–



а)



б)

Рис. 8.7. Расщелины верхней челюсти и неба у плодов в 13 недель беременности. Профиль плода с трисомией 18 (а) и поперечное сечение (б). Эхограммы любезно предоставлены Е. С. Некрасовой (а) и Д. В. Ворониным (б)

верхней челюсти (рис. 8.8). При рентгенологическом исследовании абортусов с синдромом Дауна показано, что агенезия или гипоплазия носовых костей обусловлены задержкой оксификации, которая проявляется в снижении содержания остеоцитов в костно-хрящевой ткани носа (в 2–3 раза по сравнению с нормой) [633, 771]. Отсутствие визуализации носовых костей или укорочение их длины относительно редко (0,5–0,6%) встречаются у плодов с нормальным кариотипом [211, 242], что позволило отнести этот эхографический признак к маркерам хромосомных болезней. Как показывают обобщенные данные, этот УЗМ особенно часто встречается у эмбрионов с трисомией 21, в меньшей степени — с трисомиями 13 и 18, а также с моносомией X и другими численными аномалиями половых хромосом [862]. Однако агенезия носовых костей у плодов с хромосомной патологией имеет место лишь в небольшом проценте случаев. Поэтому предложены процентильные таблицы длины костей спинки носа для каждой недели беременности [662]. Приносит ли количественная оценка этого показателя какие-либо дополнительные преимущества по сравнению с качественной оценкой (наличие или отсутствие) носовых костей, пока неясно.

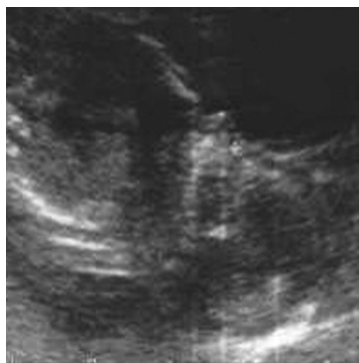


Рис. 8.8. Гипоплазия носовых костей у плода с трисомией 13 (длина НК 1,9 мм). Эхограмма любезно предоставлена Е. С. Некрасовой

Гипоплазия средней части лица, придающая характерный для трисомии 21 уплощенный профиль, сопровождается и уменьшением размеров верхней челюсти. Известно, что в норме длина верхней челюсти увеличивается линейно на 0,1 мм при увеличении копчико-теменного размера на 1 мм, тогда как этот параметр у каждого четвертого эмбриона с трисомией 21 оказывается ниже 5-го процентиля для соответствующего срока беременности [668]. Укорочение верхнечелюстной кости чаще наблюдается при отсутствии или укорочении носовых костей. По-видимому, оба процесса обусловлены задержкой оксификации, однако, в настоящее время недоразвитие верхней челюсти рассматривается как независимый УЗМ синдрома Дауна у плода. Интересно отметить, что при других хромосомных

аномалиях, несмотря на наличие черепно-лицевых дисплазий, размеры верхней челюсти у эмбрионов в I триместре соответствуют средним нормальным значениям.

Не менее частым при хромосомной патологии является синдром задержки развития плода (**ВЗРП**), который регистрируется по несоответствию фетометрических параметров (копчиково-теменной размер и размеры трубчатых костей) акушерскому сроку беременности. Однако оценка состояния опорно-двигательного аппарата в I триместре беременности вызывает трудности. С точки зрения диагностики скелетных дисплазий необходимо не только проводить измерение длины трубчатых костей верхних и нижних конечностей, но и оценивать экзогенность костей и их форму. Информативным УЗМ в эти сроки беременности может быть изменение числа пальцев, подсчет которых осуществляется легче в I триместре, чем во II, так как они еще не сжаты в кулак [152]. К сожалению, большинство врачей УЗД не придают значения этому важному УЗМ. Между тем, полидактилия является одной из наиболее характерных фенотипических признаков трисомии 13, а мезобрахиалангия V пальца кисти — трисомии 21 (рис. 8.3).

Следует отметить, что частота хромосомной патологии у плодов с изолированными и множественными аномалиями существенно варьирует в разных исследованиях, что зависит не только от качества УЗИ, но и от объема выборки. Так, в наших скрининговых исследованиях в 10–14 недель беременности увеличение ТВП зарегистрировано у 40 из 1024 плодов, при этом 17 из них имели хромосомные аномалии. Отсутствие визуализации носовых костей в наших исследованиях было зарегистрировано в общей сложности у 4 из 852 плодов (2 случая трисомии 18 и 1 — трисомии 21) [130].

Результаты всех исследований, включая собственные (табл. 8.1), свидетельствуют о том, что при одних и тех же аномалиях, в том числе весьма характерных для определенного хромосомного дисбаланса, могут быть выявлены и другие хромосомные aberrации или отвергнута хромосомная природа этих нарушений.

При определении риска хромосомной патологии у плода на основании УЗИ следует учитывать, что любая хромосомная патология имеет *плейотропный эффект*, то есть может проявиться в формировании пороков различных органов и систем, и обнаруживает различную *пенетрантность*, которая выражается в различной частоте встречаемости

и степени поражений. Именно поэтому только по фенотипическим проявлениям невозможно установить этиологию аномалии развития, т. е. имеет она наследственный (хромосомный) характер или обусловлена другими причинами. Патогенетической связи многих МВНР и особенно УЗМ не установлено. В частности, показано отсутствие какой-либо взаимосвязи между толщиной ТВП и длиной носовых костей в 10–14 недель беременности [130, 862]. Эти данные позволяют рассматривать эти УЗМ как независимые и использовать их в качестве аддитивных при оценке риска хромосомной патологии у плода. Сочетания и других аномалий развития, в том числе и с ТВП, в настоящее время определяются возможностями их одновременной визуализации в одни и те же сроки развития плода.

Таким образом, хромосомный дисбаланс, в том числе и совместимый с постнатальным развитием, не приводит к специфичным аномалиям у зародышей I триместра развития. Все известные на этой стадии нарушения носят неспецифический характер и, по-видимому, обусловлены общей задержкой развития и патологией сосудистой системы. Детализация многих пороков с помощью УЗД становится реальной только к концу I триместра, т. е. в 14 недель беременности, а более полной — во II триместре (18–24 недели).

8.4. Фенотипические проявления хромосомных аномалий во II триместре беременности

Фенотипические проявления хромосомных aberrаций во II триместре беременности значительно более многообразны (табл. 8.2). У некоторых плодов с хромосомным дисбалансом отмечаются изолированные, у большинства — множественные пороки различных органов и систем, однако их частота и спектр варьируют в широком диапазоне. Согласно обобщенным мировым данным (табл. 8.3), частота хромосомных нарушений у плодов с изолированными пороками развития, такими как вентрикуломегалия, голопрозэнцефалия, расщелины лица, врожденные пороки сердца и многие другие возрастает в среднем в 5–10 раз при их сочетании с другими УЗМ.

Различная степень повторяемости отдельных пороков и УЗМ при различной хромосомной патологии послужила поводом для разработки балльной оценки риска хромосомной патологии в зависимости от типа УЗМ. Наибольшую диагностическую значимость (коэффициент 2) имеют

Таблица 8.2. Наиболее частые эхографические маркеры, регистрируемые во втором триместре беременности у плодов с распространенными геномными мутациями [787]

Ультразвуковой маркер/порок развития	+21	+18	+13	3n	45,X
Брахцефалия	+	+	+	-	+
Клубникообразная форма головки	-	+	-	-	-
Микроцефалия	-	-	+	-	+
Голопроэнцефалия	-	-	+	-	-
Вентрикуломегалия	+	+	-	+	-
Кисты сосудистых сплетений	+	+	-	-	-
Киста задней черепной ямки	+	+	+	-	-
Аномалии большой цистерны	+	+	+	-	-
Синдром Денди-Уокера	-	+	-	+	-
Агенезия мозолистого тела	-	+	-	+	-
Расщелина губы и неба	-	+	+	-	-
Лицевые дефекты	+	-	+	+	-
Микрогнатия	-	+	-	+	-
Кистозная гигрома	-	+	-	-	+
Избыточная шейная складка	+	+	+	+	-
Миеломенингоцеле	-	+	-	+	-
Дефекты нервной трубки	-	+	+	+	-
Пороки сердца	+	+	+	+	-
«Гольфный мяч»	+	-	+	-	-
Диафрагмальная грыжа	-	+	+	-	-
Отсутствие экотени желудка	+	+	-	-	-
Атрезия пищевода	-	+	-	-	-
Атрезия 12-перстной кишки	+	-	-	-	-
Омфалоцеле	-	+	+	-	-
Гиперэхогенный кишечник	+	-	-	+	-
Пиелозктазия (умеренный гидронефроз)	+	+	+	-	+
Аномалии почек	+	+	+	+	-
Асцит/отек плода	+	-	-	-	+
Расширение угла подвздошных костей	+	-	-	-	-
Аплазия/гипоплазия лучевой кости	-	+	-	-	-
Укорочение конечностей	+	+	-	+	+
Клинодактилия и гипоплазия средней фаланги мизинца	+	-	-	-	-
Перекрещенные пальцы	-	+	-	-	-
Клешневидная кисть	-	+	-	-	-
Постаксиальная полидактилия	-	-	+	-	-
Синдактилия	-	-	-	+	-
Сандалевидная стопа	+	-	-	-	-
Стопа-качалка	-	+	+	+	-
Эквиноварусная деформация стоп	+	+	-	+	-
Деформации пальцев ног	-	-	-	+	-
Задержка роста плода	-	+	-	+	-
Маловодие	-	-	-	+	-
Многоводие	-	+	-	-	-
Аномалии плаценты	-	-	-	+	-
Единственная артерия пуповины	+	+	+	-	-

Таблица 8.3. Частота хромосомной патологии у плодов с изолированными и множественными пороками развития, обнаруженными при УЗИ во втором триместре беременности

Аномалия развития	Изолированный признак		При сочетании с другими	
	Собственные данные	Данные литературы [178]	Собственные данные	Данные литературы [178]
Вентрикуломегалия	0 % (0/4)	2 %	53 % (8/15)	17 %
Голопроэнцефалия	0 % (0/2)	4 %	67 % (4/6)	39 %
Кисты сосудистых сплетений	0 % (0/71)	1 %	19 % (11/58)	48 %
Расщелины лица	33 % (1/3)	0 %	63 % (5/8)	51 %
Гигрома шеи	85 % (6/7)	52 %	44 % (4/9)	71 %
Избыточная шейная складка	17 % (1/6)	19 %	12 % (2/26)	45 %
Диафрагмальная грыжа	100 % (1/1)	2 %	33 % (1/3)	49 %
Пороки сердца	25 % (1/4)	16 %	41 % (9/22)	64 %
Гиперэхогенный фокус в желудочках сердца («гольфный мяч»)	21 % (3/14)	0,80 %	7 % (2/30)	–
Гидроторакс	–	–	80 % (8/10)	–
Атрезия 12-перстной кишки	50 % (2/4)	38 %	50 % (4/2)	64 %
Гиперэхогенный кишечник	10 % (2/21)	7 %	11 % (5/45)	42 %
Омфалоцеле	0 % (0/8)	8 %	30 % (6/20)	46 %
Пороки мочевыделительной системы	0 % (0/4)	3 %	0 % (0/6)	24 %
Пиелоктазия	5 % (1/20)	3 %	6 % (3/51)	31%
Гастрошизис	0 % (0/1)	Популяционная	0 % (0/1)	–
Укорочение трубчатых костей	0 % (0/3)	10 %*	28 % (5/18)	?
Аномальная установка стоп	0 % (0/5)	0 %	30 % (9/31)	33 %
Задержка развития плода	38 % (3/8)	4 %	20 % (5/25)	38 %
Генерализованный отек плода	38 % (3/8)	2–80 %	33 % (5/15)	?
Единственная артерия пуповины	0 % (0/13)	–	21 % (5/24)	–
Многоводие	0 % (0/2)	–	38 % (5/13)	–
Маловодие	12 % (1/9)	–	12 % (4/33)	–
Увеличение межворсинковых пространств/кисты в плаценте	0 % (0/2)	–	33 % (2/6)	–

* Частота при трисомии 21

анатомические пороки и утолщение шейной складки. Другим УЗМ, таким как укорочение трубчатых костей, пиелозктазия (≥ 3 мм), гиперэхогенный кишечник, эхогенный фокус в желудочках сердца (> 2 мм), кисты сосудистых сплетений присвоен коэффициент 1 [178, 787].

Как в нашем исследовании, так и в работах других авторов, у плодов с хромосомными болезнями наиболее часто встречаются аномалии лица и шейного отдела, сердца и магистральных сосудов (табл. 8.4). Реже они затрагивают форму черепа, структуры головного мозга, органы брюшной полости (кишечник и почки). У плодов с наиболее распространенными геномными мутациями наблюдаются различные сочетания отдельных пороков. Характерным маркером хромосомных болезней является объем околоплодных вод. Нередко маловодие может быть единственным маркером, поскольку отсутствие околоплодных вод препятствует исследованию органов и систем плода. Одним из частых дополнительных маркеров хромосомных болезней является аплазия или гипоплазия артерии пуповины. В отдельных случаях отмечаются нарушения плаценты.

Описание фенотипических проявлений хромосомных болезней в последнее время, как правило, ограничено ультразвуковым сканированием во втором, реже в третьем триместрах беременности. Лишь в отдельных случаях оно дополняется патоморфологическими исследованиями плода после искусственного прерывания беременности в поздние сроки, что обусловлено ограниченными профессиональными возможностями патологоанатомической службы для обследования плодов весом менее 500 г.

Учитывая актуальность проблемы фенотипирования плодов с хромосомным дисбалансом, а также отсутствие унифицированных подходов к сопоставлению ультразвуковых и патологоанатомических диагнозов, представляется целесообразным остановиться подробнее на фенотипических проявлениях наиболее частых хромосомных болезней, установленных нами во II триместре беременности. При этом в большинстве случаев наличие УЗМ, включая ВПР, служило показанием к проведению пренатального кариотипирования. Реже оно сочеталось с другими факторами риска (возраст, биохимические маркеры хромосомной патологии и пр.) (см. главу 9). Однако в ряде случаев первичное УЗИ 2-го уровня позволяло обнаружить маркеры хромосомных болезней уже после инвазивной диагностики, а повторное УЗИ после

Таблица 8.4. Ультразвуковые маркеры во II триместре беременности при наиболее часто встречающихся геномных мутациях (собственные исследования)

Аномалии развития	Аномалия кариотипа				
	+21	+18	+13	45,X	3n
	N = 28	N = 18	N = 5	N = 11	N = 8
Череп и головной мозг					
Аномалии формы черепа	–	3	1	1	–
Кисты сосудистых сплетений	–	11	–	–	–
Агенезия мозолистого тела	–	1	–	–	3
Вентрикуломегалия	3	2	3	–	–
Голопроэнцефалия	–	–	–	1	1
Другие аномалии головного мозга	2	–	3	–	4
Лицо, уши, шея					
Лицевые расщелины	–	1	2	–	4
Микрофтальмия/гипертелоризм	–	1	2	–	–
Микрогнатия	2	–	–	–	1
Уплощенный профиль	3	–	–	–	–
Аномалии ушных раковин	1	–	–	–	–
Избыточная шейная складка	9	1	–	–	–
Кистозная гигрома шеи	1	1	–	8	–
Грудная клетка					
Гидроторакс	4	1	–	3	–
Диафрагмальная грыжа	–	1	–	–	2
Пороки сердца	4	2	1	1	1
Гиперэхогенный фокус в сердце	3	1	–	–	1
Брюшная полость					
Омфалоцеле	–	4	–	1	1
Атрезия двенадцатиперстной кишки	6	–	–	–	–
Гиперэхогенный кишечник	3	1	–	–	3
Аномалии почек	–	1	–	1	2
Конечности					
Укорочение трубчатых костей	2	1	–	–	2
Аномалии рук, кистей, пальцев	–	1	2	–	2
Аномалии ног и стоп	1	6	1	–	4
Отек плода (водянка)	2	1	–	3	–
Задержка внутриутробного развития	1	1	–	3	3
Другие пороки у плода	–	–	–	–	3
Аномалии провизорных органов					
Околоплодные воды					
Маловодие	1	–	–	1	3
Многоводие	4	–	–	1	–
Единственная артерия пуповины	2	–	–	1	2
Увеличение межворсинкового пространства в плаценте	2	–	–	–	–

Таблица 8.5. Число ультразвуковых маркеров при наиболее часто встречающихся хромосомных болезнях у плода во II триместре беременности

Число УЗМ	Аномалия кариотипа				
	+21	+18	+13	45,X	3n
	N = 23	N = 18	N = 5	N = 11	N = 6
Один УЗМ	7 (30,4 %)	3 (16,7 %)	2 (40 %)	6 (54,5 %)	1 (16,7 %)
Два и более УЗМ	16 (69,6 %)	15 (83,3 %)	3 (60 %)	5 (45,5%)	5 (83,3%)
Наиболее частое число УЗМ	3	2	3	1	3

кариотипирования плода — дополнить список выявленных аномалий развития. Благодаря такому подходу у большинства плодов с хромосомной патологией удалось зарегистрировать более одного УЗМ, за исключением моносомии X, при которой, в основном, отмечалась кистозная гигрома шеи (табл. 8.5).

8.4.1. Трисомия 21

Прежде всего, следует отметить, что у плодов с трисомией 21 встречается достаточно широкий спектр УЗМ и пороков развития (табл. 8.2, 8.4). Согласно обобщенным данным, полученным при анализе 461 плода с трисомией 21 [178], рейтинговая шкала эхографических признаков синдрома Дауна включает избыточную шейную складку (38%), умеренный гидронефроз (30%), укорочения бедренной кости (28%), пороки сердца (26%), аномалии конечностей (25%), вентрикуломегалию (16%), брахицефалию (15%). Среди других отклонений лидирует задержка развития (20%). Одним из наиболее характерных эхографических признаков трисомии 21 считается сочетание умеренного гидронефроза (пиелозктазия) с другими пороками развития. Так, если при изолированном гидронефрозе вероятность трисомии 21 у плода составляет всего 0,62%, то при наличии хотя бы еще одного маркера она возрастает до 5%, а при числе маркеров более двух — превышает 15%. Следует обратить внимание, что слабо выраженные пороки могут остаться невыявленными [178], а вопрос о диагностической ценности отдельных УЗМ для расчета риска синдрома Дауна у плода продолжает оставаться дискуссионным [787].

Характерными фенотипическими признаками Тс21 в наших исследованиях оказались утолщение шейной складки (рис. 8.9), гидроторакс, атрезия двенадцатиперстной кишки, пороки сердца (рис. 8.10) и многово-



Рис. 8.9. Избыточная шейная складка у плода с трисомией 21 в 22 недели беременности. Эхограмма любезно предоставлена В. М. Лебедевым



Рис. 8.10. Дефект межжелудочковой перегородки сердца у плода с трисомией 21 в 23 недели беременности. Эхограмма любезно предоставлена В. М. Лебедевым

дие. Аномалии головного мозга, дизморфия ушных раковин, укорочение трубчатых костей, аномалии дистальных отделов конечностей (клинодактилия и гипоплазия средней фаланги V пальца) и другие УЗМ зарегистрированы у меньшего числа плодов (табл. 8.4). У 18 из 28 плодов отмечены сочетания двух и более УЗ-маркеров (табл. 8.5). Эти данные хорошо согласуются с наблюдениями других авторов [178, 787].

Вместе с тем, нередко при трисомии 21 нарушения развития не визуализируются даже при повторном УЗИ. Или, как, например, в нашей практике, примерно в 30% случаев регистрируется лишь по одному УЗМ (табл. 8.5).

При патоморфологическом исследовании 6 плодов с трисомией 21 данные ультразвукового исследования полностью подтвердились. Кроме того, у всех плодов были обнаружены характерные для синдрома Дауна признаки [125, 181, 694]: плоское лицо, широкая переносица, гипертелоризм, косой разрез глаз, эпикант, макроглоссия, низко расположенные диспластичные уши, короткая широкая шея со складкой, поперечная ладонная складка и продольная на стопе, аномальное расположение пальцев рук и у одного плода 15 недель беременности — порок сердца (АВК), не зарегистрированный при УЗИ. Исследование лицевых структур внесено в протокол скринингового УЗИ во II триместре беременности [133], однако, как показывает практика, особенностям профиля уделяется недостаточно внимания. Между тем, наиболее вы-

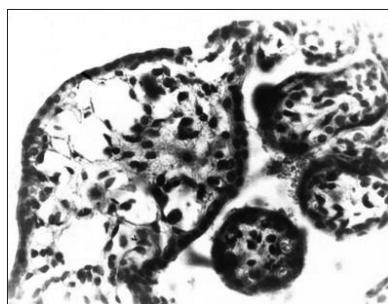
раженные при синдроме Дауна фенотипические признаки доступны для регистрации во II триместре (рис. 8.11).

У двух плодов с трисомией 21 при УЗИ отмечено расширение межворсинковых пространств в плаценте. При гистологическом исследовании плацент выявлены незрелые ворсинки с раскрытыми стромальными каналами (рис. 8.12, а) и дистрофическими изменениями с характерными отложениями фибриноида (рис. 8.12, б).

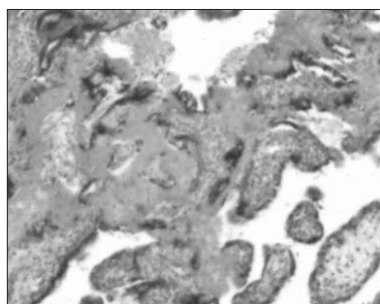
Для верификации цитогенетического диагноза у плодов II и III триместров беременности были использованы образцы ДНК, выделенные из тканей и органов плодов (мышцы, кожа, почка, легкие, сердце), а также пуповины, амниона и плаценты. В трех из 6 случаев



Рис. 8.11. Аномалии лицевого черепа (уплощенная переносица, гипоплазия носовых костей, макроглоссия, микрогнатия) у плода с трисомией 21 в 26 недель беременности



а)



б)

Рис. 8.12. Морфология ворсин плаценты при трисомии 21 (26 недель беременности). На гистологических срезах плаценты визуализируются раскрытые стромальные каналы (а) и отложения фибриноида (б). Окраска гематоксилином и эозином. Препараты любезно предоставлены О. А. Добротворцевой

методом ПЦР было установлено материнское происхождение дополнительной хромосомы 21. Остальные случаи оказались неинформативными. В отличие от I триместра, где полная форма трисомии 21, установленная в цитотрофобласте хориона, была верифицирована в других тканях во всех исследованных 15 случаях, препятствием к применению цитогенетических и FISH методов явилась выраженная мацерация тканей (рис. 8.13).

Таким образом, наши данные в целом хорошо согласуются с обобщенными мировыми данными и свидетельствуют о том, что для плодов с трисомией 21 характерны множественные аномалии, в сочетании с избыточной шейной складкой и пиелозктазией. Вместе с тем, они убеждают в целесообразности оценки профиля плода и дистальных отделов конечностей при УЗИ. Специалисты УЗД рассматривают аномалии лица (глазниц и носа, микрогнатию, макроглоссию, размеры и положение ушных раковин) как сопутствующие другим нарушениям развития [178]. Однако мы убеждены, что их визуализация заслуживает внимания в качестве самостоятельных УЗМ хромосомной патологии даже при отсутствии других аномалий развития.

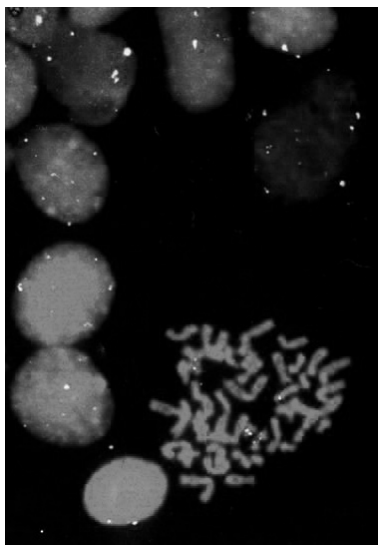


Рис. 8.13. Препарат из плаценты (15 неделя беременности). FISH с ДНК-зондом, специфичным к прицентромерным районам хромосом 21 и 13. Полиморфизм размеров сайтов-мишеней, а также ассоциации ЯОР хромосом 21 и 13 исключают корректную оценку числа гибридных сигналов на интерфазных ядрах

8.4.2. Трисомия 18

Трисомия 18, как правило, сопровождается выраженной задержкой развития плода (74%) и МВПР, в которые могут быть вовлечены любые органы, наиболее часто — омфалоцеле (в 10–20 раз чаще, чем у плодов с нормальным кариотипом).

Согласно обобщенным данным [178], из 137 плодов с синдромом



Рис. 8.14. Кисты сосудистых сплетений у плода с трисомией 18 в 22 недели беременности. Эхограмма любезно предоставлена В. М. Лебедевым

Эдвардса почти половина имели кисты сосудистых сплетений мозга, характерную клубничкообразную форму головы, микрогнатию и пороки сердца. Типичными для таких плодов были также аномалии конечностей (72%).

В наших наблюдениях синдрому Эдвардса сопутствовали, в основном, кисты сосудистых сплетений (рис. 8.14) и пороки развития конечностей (аномальная установка кистей и пальцев, стопа-качалка) (табл. 8.4). В 83% случаев наблюдалось сочетание

двух и более УЗМ и/или пороков (табл. 8.5).

При патоморфологическом исследовании четырех плодов с трисомией 18 получено подтверждение анатомических пороков, выявленных с помощью УЗИ. У плода с кистой в брюшной полости диагностированы пороки мочевыводящих путей (поликистоз почек, односторонний гидроуретр, мегацистик). У этого же плода при УЗИ и при патоморфологическом исследовании обнаружено трехкамерное сердце с общим артериальным стволом и дефектом межжелудочковой перегородки. Кисты сосудистых сплетений, обнаруженные при УЗИ в обоих полушариях головного мозга у этого плода, при вскрытии имели вид желеобразных включений янтарного цвета.

Следует отметить, что нарушения головного мозга, которые отмечаются при УЗИ практически во всех случаях, на вскрытии диагностируются лишь в 18% [181], что обусловлено аутолизом мозговой ткани. Следовательно, в случае аномалий головного мозга УЗИ может оказаться более информативным, чем патоморфологический анализ. То же справедливо и для некоторых аномалий почек (кисты, гидро- и мегауретр) [181].

При гистологическом исследовании хориона (1 случай) и плаценты (2 случая) у плодов с трисомией 18 выявлено аномальное строение ворсин (крупные, недостаточно разветвленные ворсины, пальцеобразные выросты, строма с фибриноидными включениями, двухслойный трофобласт, синцитий в виде «щетки») (рис. 8.15).

Верификация диагноза в одном из 10 случаев (FISH с ДНК-зондом

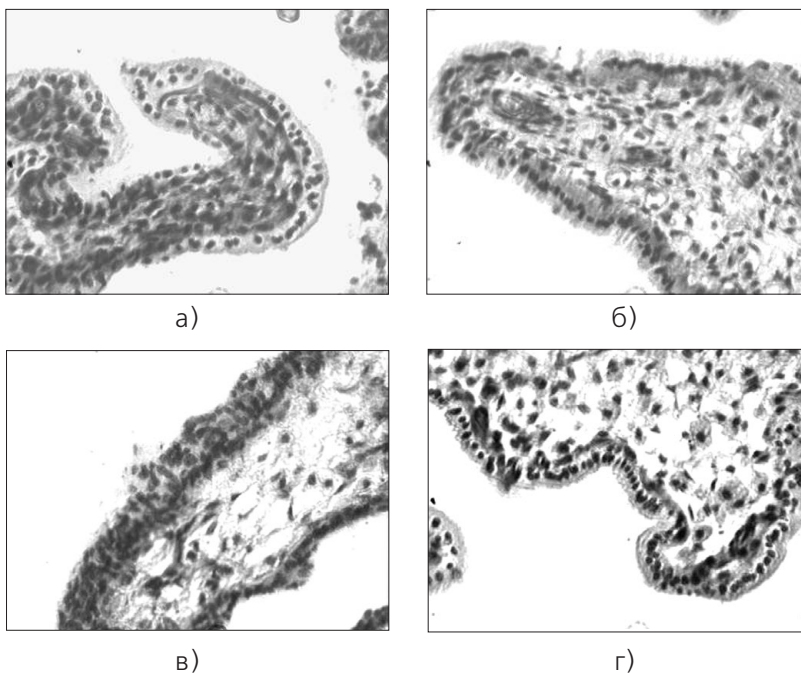


Рис. 8.15. Специфические изменения структурных элементов хориона и плаценты у плодов с трисомией 18: а, б — округлые, многослойно расположенные ядра синцитиотрофобласта (в 14 и 22 недели соответственно); в и г — расположение ядер в виде щетки (в 14 и 23 недели соответственно). Препараты любезно предоставлены О. В. Кирилловой

на прицентромерный район хромосомы 18) при наличии полной Тс18 в цитотрофобласте показала наличие мозаичного кариотипа 47,XY,+18/45,XY,-18/46,XY в тканях плода. В остальных 9 случаях верифицирована полная форма трисомии 18 (рис. 8.16).

Таким образом, для плодов с трисомией 18 в большей мере, чем для трисомии 21 характерны множественные пороки развития, а наиболее частым УЗМ являются кисты сосудистых сплетений. К сожалению, наличие кист сосудистых сплетений почти у 3% плодов с нормальным кариотипом, а также транзитный характер этой патологии существенно снижают их диагностическую ценность. Вместе с тем, сочетание данной аномалии с другими нарушениями эмбриогенеза, такими как

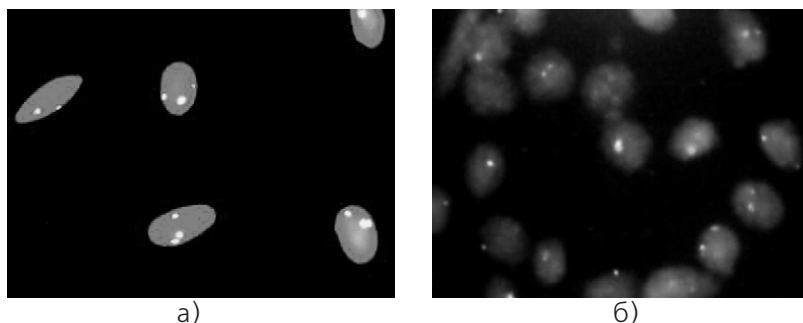


Рис. 8.16. FISH с ДНК-зондом D18Z1 на препаратах интерфазных ядер из аутопсийного материала — кишечный эпителий (а) и ткани легкого (б)

задержка развития, аномалии формы черепа и скелета, омфалоцеле существенно увеличивают вероятность выявления этой хромосомной патологии.

8.4.3. Трисомия 13

Спектр аномалий развития у плодов с трисомией 13 во II триместре достаточно обширен (табл. 8.2). Наиболее частыми аномалиями, диагностированными с помощью УЗИ у 34 плодов с трисомией 13 оказались задержка развития (61%), аномалии трубчатых костей (52%), пороки сердца (52%), голопрозэнцефалия (39%) умеренный гидронефроз (37%), микроцефалия (24%), шейный отек (22%), лицевые расщелины (22%) и кисты задней черепной ямки (15%) [178]. Согласно нашим данным, наиболее частыми нарушениями у плодов с синдромом Патау являются пороки развития головного мозга и лицевого черепа, сердца и конечностей (табл. 8.4). У трех из пяти плодов отмечено наличие более двух аномалий развития (табл. 8.5).

При патоморфологическом исследовании двух плодов с трисомией 13 дополнительных анатомических пороков выявить не удалось, за исключением расщелины верхней губы и неба, которые не были диагностированы при УЗИ у одного плода.

Таким образом, типичные для трисомии 13 скелетные аномалии (расщелины лица, полидактилия) в сочетании с задержкой развития плода и пороками внутренних органов, в т. ч. пороками сердца, доступны для регистрации при УЗИ.

8.4.4. Моносомия X

В отличие от полиморфных и нередко транзиторных УЗМ при аутосомных трисомиях, которые совместимы с живорождением, типичным для зародышей с моносомией X является наличие кистозной гигромы шеи (88%), которая не столь типична для других хромосомных аберраций. У большинства плодов с моносомией X регистрируются водянка плода и задержка развития с укорочением трубчатых костей [178]. Эти же УЗМ были типичными для плодов 45,X и в наших исследованиях (табл. 8.4).

Лимфоотек рассматривается как проявление персистирования эмбриональных лимфатических мешков и нарушения оттока лимфы в венозную систему [91]. Считается, что все перечисленные пороки характерны для летальных форм синдрома Шерешевского–Тернера [178]. Однако в некоторых случаях они совместимы с внутриутробным развитием, а следствием нарушений лимфооттока у новорожденных являются наиболее убедительные признаки синдрома Шерешевского–Тернера — короткая складчатая шея («шея сфинкса»), отеки кистей и стоп.

При верификации пренатального диагноза с помощью цитогенетического и FISH методов полная форма 45,X подтверждена у всех плодов. Ни в одной из тканей не установлено присутствие клеточных линий с иным набором хромосом.

8.4.5. Кариотипы 47,XXY и 47,XXX

Эти типы трисомий вполне совместимы с постнатальным развитием и обычно не сопровождаются врожденными пороками. Интересно в этой связи отметить, что в наших исследованиях у таких плодов были выявлены пороки развития: в одном случае (кариотип 47,XXY) это была копчиковая тератома, в другом — порок сердца. В случае 47,XXX было обнаружено омфалоцеле. Эти признаки не являются характерными для данных синдромов, и такие находки можно отнести к разряду случайных.

У плода с кариотипом 47,XXX при отсутствии УЗМ патоморфологическое исследование показало, что яичники представлены соединительнотканными тяжами.

Исследование аутопсийного материала цитогенетическими и FISH-методами в наших исследованиях не выявило хромосомного мозаицизма.

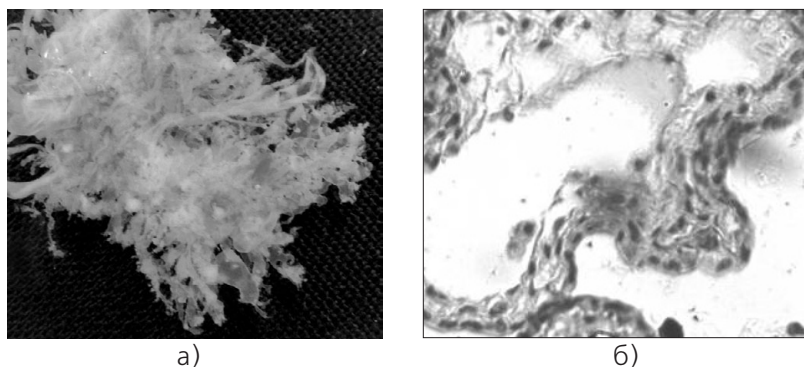


Рис. 8.17. Изменения хориона (а, 11 недель беременности) и плаценты (б, 24 недели беременности) при триплоидии: а — «бокаловидная» форма ворсин плаценты при триплоидии (ув. 60×); б — увеличение стромальных каналов и многослойный синцитий (гистологический срез)

8.4.6. Триплоидия

Согласно данным литературы, наличие дополнительного гаплоидного набора хромосом, обычно отцовского происхождения (результат диспермного оплодотворения), совместимо с внутриутробным развитием. Однако во II триместре беременности триплоидия ассоциируется с выраженной задержкой развития (100 %), укорочениями (60 %) и аномалиями конечностей (76 %), аномалиями лицевого черепа (микрогнатия — 44 %), пороками сердца (16 %) [40, 178].

Ведущими УЗМ при триплоидии в наших исследованиях оказались задержка внутриутробного развития, маловодие, пороки развития головного мозга (синдром Денди–Уокера), конечностей (сандалевидная стопа) и внутренних органов, а также лицевые расщелины (табл. 8.4). В подавляющем большинстве случаев наблюдалось более двух аномалий развития (табл. 8.5). При гистологическом исследовании обнаружены патологические изменения формы и структуры ворсин хориона и плаценты, характерные для частичного пузырного заноса (рис. 8.17).

8.5. Стратегия исследований корреляций кариотип — фенотип в эмбриогенезе человека

Возможность детального прижизненного исследования плодов человека с уже установленным кариотипом открывает новые, недоступные ранее, перспективы для изучения фенотипических особенностей

проявления хромосомных aberrаций на разных стадиях эмбриогенеза человека. Именно такой комплексный подход нам представляется важным и особенно перспективным для решения задач цитогенетики развития человека.

Так, исследования с помощью методов УЗД позволяют установить целый ряд аномалий головного мозга, которые в результате аутолиза и механических повреждений оказываются малопригодными для макроскопического и микроскопического анализа. Аналогичная ситуация отмечается в отношении аномалий почек, в частности, пиелэктазии (гидронефроза). С другой стороны, в ряде случаев у плодов при вскрытии регистрируются пороки, которые в силу различных причин не были отмечены при УЗИ. Сопоставление результатов УЗИ и патологоанатомического диагноза показывает, что доля ложноположительных и ложноотрицательных заключений может варьировать от 3 до 26% [45, 77].

Кроме повышения эффективности пренатальной диагностики, такой комплексный подход позволяет решать и ряд фундаментальных задач. Так, во всех случаях моносомии X и триплоидии плоды имели несовместимые с жизнью пороки развития, выявленные при УЗИ. Полученные результаты и данные литературы свидетельствуют о том, что такие частые во второй половине беременности пороки как кистоз почек (характерный для трисомий 13 и 18) или атрезия двенадцатиперстной кишки (при трисомии 21), аномалии лимфатической системы (при моносомии X) и многие другие, могут быть выявлены уже на 8–10 неделях развития. Следовательно, УЗ-метод пренатальной диагностики позволяет анализировать специфику пороков на протяжении всего периода органогенеза, а сведения, полученные при патоморфологических исследованиях аутопсийного материала после прерывания беременности в I триместре беременности, помогают воссоздать полную картину генеза отдельных пороков, и, следовательно, приблизиться к пониманию патогенеза сочетанных аномалий развития. Очевидно, что такой подход ранее был недоступен при исследовании не только спонтанных абортусов разных сроков развития, но и абортусов, индуцированных во II триместре беременности. Кропотливый труд и ювелирная техника белорусских морфологов, возглавляемых профессором Г. И. Лазюком, по исследованию эмбрионов 7–12 недель развития с хромосомным дисбалансом, абортированных после пренатальной диагностики, позволили установить

интересные факты формирования пороков. Так, показано, что первичным при кистозе почек у плодов с Тс13 является их чрезмерная дольчатость, возникающая вследствие гипоплазии нефрогенной зоны. Это принципиально отличает данный порок от кистозных изменений почек при других хромосомных синдромах [77]. Удалось установить, что отличительной особенностью нарушений сердечно-сосудистой системы у плодов с кариотипом 45,X является гипоплазия дуги аорты на участке между левой сонной и левой подключичной артериями, по диаметру сопоставимая с сонной артерией [115]. Эти результаты наглядно демонстрируют не только возможности патоморфологических исследований эмбрионов I триместра, но и представляют собой принципиально новый подход к выяснению патогенеза изолированных и сочетанных пороков, к изучению иерархии нарушений морфогенеза, к пониманию компенсаторных механизмов в процессе дальнейшего внутриутробного развития.

Не менее интересным в этом плане является изучение аномалий развития экстраэмбриональных органов. При УЗИ в I триместре беременности основное внимание уделяется оценке состояния желточного мешка, который осуществляет важные функции по обеспечению нормального развития эмбриона (см. главу 1). Персистенция или преждевременное исчезновение желточного мешка являются прогностическими признаками неблагоприятного развития беременности, часто завершающейся спонтанными абортами [133]. При УЗ-сканировании в ранние сроки беременности визуализируется также амниотическая оболочка, которая сливается с хорионом к концу I триместра. Исследования амниотической (целомической) и хориальной (экзоцеломической) полостей представляют собой специализированный вид исследований и не используются в широкой практике, тем более, в рамках УЗ-скрининга.

В плане УЗМ хромосомной патологии интерес представляют также длина, толщина и индекс извитости пуповины. Визуализация пуповины возможна в I триместре беременности, точнее с 9-й недели, когда пуповина приобретает спиралевидный ход, а ее длина примерно соответствует копчико-теменному размеру. Число витков (13–15) пуповины окончательно формируется к концу I триместра [160]. Индекс спирализации (число петель на длину пуповины) и угол между продольной осью и артериями пуповины максимальны в конце I — начале

II триместра и снижаются по мере прогрессирования беременности [799]. Диаметр сосудов (две артерии и одна вена) и длина пуповины, которая во II триместре имеет структуру канатика, линейно растут до 32–35 недель, а затем за счет естественного уменьшения вартонова студня — прогрессивно уменьшаются. Оказалось, что при некоторых анеуплоидиях (трисомии 18 и 21, моносомия X) толщина пуповины в 14–23 недели может превышать нормальную [720]. Кроме того, при синдроме Дауна пуповина характеризуется уменьшением числа петель, т. е. снижением индекса спирализации [799]. Однако в настоящее время лишь гипоплазия артерии пуповины во II триместре беременности завоевала признание в качестве УЗМ хромосомной патологии.

При оценке структуры хориона и плаценты основное внимание обращается на их толщину в области пуповины. Утолщение плаценты наблюдается при водянке плода, гемолитической болезни, сахарном диабете и инфекциях, истончение — при плацентарной недостаточности. Во II триместре по 4-балльной шкале оценивается также степень зрелости плаценты. Сроки выявления межворсинковых пространств, сопровождающихся нарушением маточно-плацентарного кровотока, колеблются от 15 до 40 недель, и их оценка представляет определенные трудности вследствие незначительных размеров. Увеличение межворсинковых пространств обычно не рассматривается как серьезное нарушение развития, хотя и влечет за собой углубленное динамичное обследование плода [133].

Основные сведения о морфологических особенностях хориона и плаценты при хромосомных нарушениях получены при исследовании этих тканей у спонтанных и медицинских абортусов. Отмечена тенденция к увеличению веса плаценты при трисомии 21 и ее уменьшение по сравнению с нормой при трисомиях 13 и 18 [815]. Характерным для всех анеуплоидий является уменьшение ветвления ворсин хориона, их слабая васкуляризация, отечность и гипоплазия трофобласта [522]. У 72,9% зародышей с трисомией аутосом отмечается незрелость ворсин, а в 62,5% случаях — нарушения их созревания [239]. Изменения ворсин при кариотипе 69,XXX и 69,XXY, как правило, соответствуют частичному пузырьному заносу, что отмечается практически у всех медицинских и спонтанных абортусов с триплоидией [116].

Одной из любопытных находок в наших исследованиях оказалось устойчивое изменение структуры синцития, проявляющееся в много-

слоynom расположении ядер округлой формы в виде «щетки», зарегистрированное у плодов с трисомией 18 разных сроков развития (14, 22 и 24 недели беременности). Эта аномалия свидетельствует, по-видимому, о нарушениях дифференцировки цитотрофобласта (рис. 8.15). Однако специфичность этого признака для трисомии 18 требует подтверждения. В целом, как следует из обобщенных данных литературы и результатов собственных исследований, патоморфологические изменения плаценты при геномных мутациях неспецифичны и, скорее, отражают нарушения функций плаценты. Пока наблюдения за развитием гетероплоидных зародышей и их провизорных органов на разных сроках развития носят ориентировочный характер. Однако они наглядно демонстрируют высокую информативность комплексного цитогенетического и морфофункционального подхода к проблеме раннего онтогенеза человека.

Причины нарушения морфогенеза в условиях хромосомного дисбаланса по-прежнему остаются малопонятными. Опыты *in vitro* на культурах анеуплоидных клеток убедительно показали их низкую жизнеспособность, изменения параметров клеточного цикла, нарушения подвижности и состава межклеточного матрикса [47, 93, 96]. На основании этих данных К. Н. Гринбергом и его учениками были сформулированы представления о специфическом фенотипе клеток с гетероплоидным кариотипом и высказано предположение о наличии клеточного «канализованного механизма» реализации хромосомного дисбаланса [96]. Авторы этих исследований отмечают однотипный характер цитологических изменений, так называемый «клеточный синдром», многие проявления которого фактически не зависят от специфики хромосом, вовлеченных в трисомию. Признавая безусловную ценность этих исследований, уместно обратить внимание на то, что они проведены на материале спонтанных абортот в условиях опытов *in vitro*.

До сих пор в литературе отсутствует обобщающая, фундаментальная теория патогенеза хромосомных болезней человека. В этой связи уместно отметить, что хромосомные нарушения, возникающие в гаметогенезе или на ранних стадиях эмбриогенеза человека вполне могут быть сравнимы с повреждающими экзогенными факторами, действующими на разных стадиях эмбриогенеза. Согласно теории критических периодов развития П. Г. Светлова, у зародышей млекопитающих и человека выделяют два критических периода развития — период бластуляции, совпадающий со временем имплантации, и период активного органогенеза, соответствующий

периоду плацентации [170]. Развитию каждого эмбрионального зачатка предшествует свой критический период, воздействие во время которого приводит к нарушениям процессов морфогенеза, результатом чего собственно и являются пороки развития (аномалии).

Анализ особенностей фенотипического проявления хромосомных aberrаций в эмбриогенезе человека хорошо укладывается в теорию критических периодов развития П. Г. Светлова. Так, анализ доимплантационных зародышей человека указывает на массовую гибель зародышей с хромосомными aberrациями (бластопатии), в том числе с мозаицизмом хромосом, при переходе от стадии морулы к стадии бластоцисты. Элиминация гетероплоидных зародышей во время имплантации и плацентации (эмбриопатии), скорее всего, обусловлена «клеточным синдромом» хромосомных aberrаций (см. выше), затрагивающим и провизорные органы формирующегося зародыша. Наконец, многочисленные аномалии (ВПР и МВПР) и эмбриональная гибель гетероплоидных зародышей, регистрируемые на более поздних стадиях, являются результатом структурных повреждений отдельных эмбриональных зачатков и систем, которые влекут за собой и функциональные расстройства. При этом спектры морфологических и функциональных повреждений при дисбалансе разных хромосом могут не совпадать. В постнатальном периоде они реализуются в те или иные синдромы хромосомных болезней. При отсутствии или ослаблении соответствующих компенсаторных механизмов, такие нарушения могут быть причиной гибели зародышей с хромосомными aberrациями во II триместре беременности (фетопатии). Таким образом, фенотипические проявления хромосомных нарушений в эмбриогенезе человека можно рассматривать как еще одно подтверждение теории критических периодов развития, которая объясняет механизмы реализации не только повреждающего действия экзогенных факторов, но и геномного дисбаланса.

Можно надеяться, что по мере дальнейшего совершенствования ультразвуковой техники и заинтересованности врачей УЗД и патоморфологов, особенности эмбрионального развития гетероплоидных зародышей будут детально изучены. Возможно, только в настоящее время на основе принципов функциональной геномики будет сформулирована общая теория взаимоотношения фенотипа и кариотипа при хромосомном дисбалансе. Некоторые аспекты этой интересной проблемы будут рассмотрены в главах 10 и 11.

Заключение

В последние годы, благодаря успехам пренатальной диагностики, разработке эффективных методов прижизненного исследования плодов человека с хромосомными aberrациями, появились принципиально новые возможности и для решения проблем цитогенетики развития, в частности, для понимания роли отдельных хромосом и их сегментов в нормальном и патологическом эмбриогенезе человека. Обобщенный мировой опыт и результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что на уровне развивающегося зародыша, как и в постнатальном периоде онтогенеза, ведущими в проявлении хромосомного дисбаланса являются неспецифические морфологические нарушения, такие как общая задержка развития, укорочение трубчатых костей, расширение воротникового пространства, аномалии сердца, лицевого черепа, омфалоцеле и ряд других. Все эти аномалии могут быть обнаружены при любой хромосомной патологии, хотя их соотношение и частота могут существенно варьировать. К сравнительно редким специфическим типам аномалий можно отнести кистозную гигрому шеи при моносомии X, омфалоцеле при трисомии 18 и лицевые расщелины при трисомии 13. Все эти данные уже сегодня позволяют существенно повысить эффективность пренатальной диагностики, то есть они имеют большую практическую значимость. Вместе с тем, УЗИ любого уровня сложности и даже вычленение определенных УЗ-синдромов хромосомных болезней не позволяют с полной достоверностью судить о наличии хромосомных нарушений у плода и, тем более, ставить диагноз того или иного наследственного синдрома. Точный диагноз хромосомной болезни может быть установлен только путем цитогенетического анализа. Несмотря на важные методические достижения в цитогенетике эмбрионального развития человека, уже имеющиеся данные убедительно доказывают, что на организменном, органном и даже тканевом уровнях загадка патологического эффекта хромосомного дисбаланса вряд ли будет решена. Необходимы более совершенные, более тонкие исследования на молекулярном и субмолекулярном уровнях, чтобы понять механизмы повреждающих эффектов хромосомных аномалий.

ГЛАВА 9 ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Введение

В соответствии с данными Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2,5–3 % всех новорожденных имеют различные пороки развития. При этом около 1 % составляют генные болезни, примерно 0,5 % — хромосомные болезни и в среднем 1,5–2 % приходится на долю врожденных пороков развития (ВПР), обусловленных сочетанием неблагоприятных экзогенных и эндогенных факторов. Известно также, что частота ВПР с возрастом увеличивается и к 10 годам может достигать 5–7 % за счет пороков развития органов зрения, слуха, нервной и эндокринной систем, не зарегистрированных при рождении.

Таким образом, очевидно, что профилактика наследственной и врожденной патологии имеет не только медицинское, но и большое социальное значение.

Решающая роль в комплексе мероприятий по профилактике и предупреждению наследственных и врожденных болезней принадлежит пренатальной диагностике, позволяющей предотвратить рождение детей с тяжелыми некорректируемыми пороками развития, с социально значимыми генными и хромосомными болезнями, и тем самым уменьшить генетический груз популяции. Естественно то внимание, которое уделяется развитию службы ПД в России со стороны Министерства здравоохранения РФ и региональных комитетов по охране здоровья матери и ребенка. Главными российскими нормативными документами по пренатальной диагностике являются Приказ МЗ РФ № 316 от 30.12.1993 и Приказ МЗ РФ № 457 от 28.12.2000.

Многолетний (18 лет) опыт практической работы нашей лаборатории в НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН

(Санкт-Петербург) по пренатальной диагностике хромосомных болезней обобщен в соответствующих публикациях [13, 15, 17, 155, 727], методических рекомендациях [16, 151, 197], в практических лабораторных руководствах [14, 192] и в главах монографии [133].

Задача данной главы — дать обзор современного состояния ПД хромосомных болезней, рассмотреть ее современные диагностические возможности и алгоритмы, наметить перспективы дальнейших исследований по повышению эффективности ПД хромосомных болезней.

9.1. Предмет и задачи пренатальной диагностики

Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней — новый раздел медицинской генетики, возникший в 80-е годы XX в. на стыке клинических дисциплин (акушерство, гинекология, неонатология) и фундаментальных наук (генетика человека, цитогенетика, молекулярная биология, эмбриология, биохимия, патофизиология).

В плане практической медицины ПД представляет собой комплекс врачебных мероприятий и диагностических методов, направленных на выявление морфологических, структурных, функциональных или молекулярных нарушений внутриутробного развития человека. Последние проявляются в виде изолированных или множественных врожденных уродств, дизрупций, деформаций, недоразвитий, хромосомных или моногенных болезней, в виде пороков или дисфункций жизненно важных систем, органов и тканей, которые приводят к гибели плода или к тяжелым, нередко смертельным, заболеваниям в постнатальном периоде.

Основные задачи ПД.

- Предоставление будущим родителям исчерпывающей информации о степени риска рождения больного ребенка.
- При наличии высокого риска — предоставление информации о возможности прерывания беременности и последствиях принятого родителями решения — родить больного ребенка или прервать беременность.
- Обеспечение ранней диагностики внутриутробной патологии и оптимального ведения беременности.
- Определение прогноза здоровья будущего потомства.

Уместно отметить, что понимание ПД только как набора диагностических методов и приемов является весьма распространенным за-

блуждением многих клиницистов. Возможность получения зародышевого материала и его анализ при помощи современных молекулярных, цитологических, биохимических и других методов практически на любой стадии внутриутробного развития позволяет не только установить точный диагноз, но и получить новую информацию о тонких механизмах эмбрионального развития человека. Как было рассмотрено в предыдущей главе (см. главу 8), это, прежде всего, касается особенностей реализации наследственной программы развивающегося зародыша человека в норме и при патологии, разработки на этой основе оптимальных способов профилактики, диагностики, а в обозримом будущем — и лечения наследственных болезней. Следовательно, имеются все основания рассматривать ПД не как простой набор диагностических методов и приемов, но как вполне самостоятельное научное направление в изучении фундаментальных проблем биологии развития (эмбриологии) человека.

9.2. Методы оценки состояния плода

Основные методы и подходы, применяемые в ПД наследственных и врожденных болезней (рис. 9.1), включают комплекс не прямых (объектом обследования является беременная женщина) и прямых (непосредственное обследование плода) методов обследования. Последние могут быть неинвазивными и инвазивными.

Главная цель всех не прямых и прямых неинвазивных методов — отбор беременных в группы высокого риска рождения детей с врожденной и наследственной патологией, которые нуждаются в углубленных дополнительных исследованиях, включающих специальные лабораторные (цитогенетические, биохимические, молекулярные) исследования плодного материала.

Непрямые методы позволяют судить о состоянии плода на основании стандартных схем акушерско-гинекологического обследования, включающих данные бактериологических, иммунологических и эндокринологических, а также биохимических анализов крови и мочи беременной. Весьма желательным, а для женщин групп высокого риска хромосомной патологии у плода обязательным, является медико-генетическое консультирование (см. раздел 9.3), дополненное, при необходимости, обследованием супружеской пары методами лабораторной генетики.



Рис. 9.1. Методы оценки состояния плода

Биохимические исследования маркерных сывороточных белков крови беременной, равно как ультразвуковое сканирование, в настоящее время рассматривают как обязательные скринирующие программы дородовой диагностики, направленные на выявление женщин групп высокого риска по рождению детей с хромосомными болезнями и пороками развития (см. главу 9.4).

Прямые методы направлены на исследование самого плода и подразделяются на неинвазивные и инвазивные. Основным и наиболее эффективным прямым неинвазивным методом является исследование плода с помощью ультразвукового (**УЗ**) сканирования. УЗИ, безусловно, следует рассматривать как наиболее эффективный неинвазивный метод ПД.

Важно отметить, однако, что многие отклонения в развитии плода (УЗ-маркеры) и даже ВПР, определяемые при УЗИ, не позволяют судить о наличии хромосомных и, тем более, генных болезней. Более того, отсутствие характерных УЗ-маркеров хромосомных болезней не является гарантией их отсутствия у плода. Диагностика хромосомных и генных болезней возможна только путем специальных генетических исследований плодного материала. Для получения плодного материала разработаны и широко используются в ПД различные инвазивные методы, список которых приведен в таблице 9.1. Главные из них: хорионбиопсия и плацентобиопсия — получение ворсин хориона или плаценты (I и II триместры беременности соответственно), амнио-

Таблица 9.1. Характеристика инвазивных методов пренатальной диагностики

Метод	Способ выполнения	Эффективность получения материала	Срок проведения, неделя	Противопоказания	Ранние осложнения
Трансцервикальная биопсия (или аспирация) хориона	Введение щипцов или катетера через цервикальный канал в просвет между стеной матки и оболочками плода, биопсия или аспирация ворсин хориона (20–100 мг)	90 % с первой попытки 96,4–99,5 % с двух попыток	8–12	Инфекции Многоплодная беременность Стеноз цервикального канала Расположение хориона по передней стенке матки	Внутриутробные инфекции 0,5 % Кровотечения 6,0–7,3 % Гематомы 3,1–4,3 % Гибель плода 19,2–32,2 %
Трансабдоминальная аспирация хориона (или плаценты)	Пункцирование брюшной стенки иглой с мандреном и аспирация ворсин хориона (2–50 мг) шприцем или вакуумной системой	95 % с первой попытки 99,4–99,7 % с двух попыток	9,5–32	Обширная миома матки Переднебрюшинное расположение петель кишечника	Перитониты 0,3 % Кровотечения 1,1–2,0 % Гибель плода 0,3*–4,4 %
Ранний амниоцентез	Пункцирование брюшной стенки иглой с мандреном, аспирация 7 мл АЖ	до 100 %	13–14	Маловодие	Маловодие Инфекции Гибель плода 1 %
Амниоцентез	Пункцирование брюшной стенки иглой с мандреном, аспирация 40 и более мл АЖ	100 %	15–20	Абсолютных нет	Маловодие Инфекции Гибель плода 0,3–1,2 %
Кордоцентез	Пункцирование свободной петли пуповины и аспирация 1–2 мл крови	95–97 %	20–34	Абсолютных нет	Хориоамниониты Истечение амниотической жидкости Гематома пуповины Брадикардия Гибель плода 0,3*–7 %

* Собственные данные

центез — получение образцов амниотической жидкости (преимущественно II триместр) и кордоцентез — пункция пуповины с целью получения крови плода (II–III триместры). Другие инвазивные методы, касающиеся биопсий различных тканей плода (мышцы, кожа, печень, селезенка) применяются только в эксклюзивных случаях.

В настоящее время зародыши человека доступны для лабораторных исследований практически на любой стадии внутриутробного развития. Однако методы, применяемые для этих целей, могут быть различны (табл. 9.2).

На самых ранних стадиях, то есть еще до имплантации, диагностика генных и хромосомных болезней у эмбриона возможна только с помощью методов и подходов, применяемых в центрах вспомогательных репродуктивных технологий. Некоторые из этих методов и подходов рассмотрены в разделе 9.12.

Наименее доступными для ПД являются зародыши периода имплантации (см. главу 1). Обычно на этих сроках беременность еще не

Таблица 9.2. Лабораторные методы пренатальной диагностики на разных сроках беременности

Срок беременности	Материал для исследования	Метод диагностики
До имплантации	Полярные тельца (1 и 2) Единичные бластомеры	FISH ДНК-диагностика
9–14 недель	Ворсинчатый хорион	Цитогенетический анализ (кариотипирование, FISH) ДНК-диагностика
	Сыворотка крови матери	Иммуноферментный анализ эмбрионспецифических белков
15–19 недель	Ворсины плаценты Амниотическая жидкость Клетки амниотической жидкости	Цитогенетический анализ (кариотипирование, FISH) ДНК-диагностика
	Сыворотка крови матери	Иммуноферментный анализ эмбрионспецифических белков
20–24 недели	Кровь из пуповины плода Клетки амниотической жидкости	Цитогенетический анализ (кариотипирование, FISH) ДНК-диагностика
	Амниотическая жидкость	Биохимический анализ

диагностируется и нередко рассматривается самой женщиной как задержка месячных. Ввиду малых размеров и высокой повреждаемости эмбриона (1-й критический период развития), невозможности применения методов получения плодного материала, ПД в эти сроки отсутствует. Биохимические методы (анализ уровня ХГЧ в сыворотке крови или моче) и ультразвуковое исследование позволяют лишь установить факт наличия беременности.

Подавляющее большинство ПД во всем мире и в России проводится после 10-й недели, преимущественно во II триместре беременности (15–25-я недели). Именно в этот период осуществляются все основные операции с целью получения плодного материала для последующих лабораторно-диагностических мероприятий (см. раздел 9.6).

В III триместре инвазивная пренатальная диагностика проводится редко в силу повышенной вероятности преждевременных родов, спровоцированных инвазивным вмешательством, а также нецелесообразности индуцированных преждевременных родов, исходом которых в обоих случаях будет рождение жизнеспособного недоношенного ребенка. По нашему убеждению, главным показанием к инвазивной ПД в III триместре является необходимость решения вопроса о тактике ведения беременности и родов в зависимости от диагноза заболевания у плода (см. раздел 9.11).

Различные специальные методы лабораторной генетики для исследования плодного материала зависят от целей и сроков ПД. Наиболее универсальными при диагностике наследственных болезней являются методы цитогенетического анализа (кариотипирование) и методы молекулярной (ДНК) диагностики.

Цитогенетические методы — методы, применяемые с целью диагностики хромосомных болезней у плода. В настоящее время проблема цитогенетической ПД на любом сроке беременности практически решена. В зависимости от срока беременности и задач исследования материалом для хромосомного анализа могут служить клетки амниотической жидкости, хориона, плаценты и лимфоциты пуповинной крови плода, полученные тем или иным инвазивным способом. Подробнее все эти методы рассмотрены нами в главах 2 и 4, а принципы и алгоритмы пренатальной диагностики хромосомных болезней — в разделе 9.7.

Молекулярные методы (ДНК-диагностика) — методы, используемые для диагностики генных болезней. Подразделяются на прямые (объектом исследования является мутантный ген) и непрямые (иден-

тификация мутантного гена проводится с помощью молекулярных маркеров). Для каждого моногенного заболевания разработан свой алгоритм молекулярной диагностики. Методическую основу молекулярной диагностики большинства генных болезней составляет полимеразная цепная реакция (ПЦР). Подробнее принципы диагностики моногенных болезней изложены в разделе 9.8.

9.3. Медико-генетическое консультирование

Медико-генетическое консультирование является наиболее распространенным видом профилактики наследственных и врожденных болезней. Суть его заключается в определении прогноза рождения ребенка с наследственной и врожденной патологией, в объяснении вероятности неблагоприятного исхода беременности и в помощи женщине (семье) в принятии решения о деторождении. Следует иметь в виду, что медико-генетическое консультирование в ПД имеет свои характерные особенности, отличающие его от традиционной работы врача-генетика. Прежде всего, его основной целью является разработка алгоритма профилактики наследственной и врожденной патологии. Важно аргументированно принять решение о целесообразности направления беременной на инвазивную ПД для исключения хромосомной или генной патологии у плода. Рекомендации генетика после ПД требуют от специалиста-консультанта не только глубоких знаний по медицинской генетике, но и широкой эрудиции в области репродукции человека, эмбриологии, тератологии, педиатрии и акушерства.

В идеальном варианте медико-генетическое консультирование должны пройти все семьи, планирующие иметь ребенка, и все женщины, направляемые на ПД (проспективное консультирование).

Прямыми показаниями для направления к специалисту-генетику являются:

- установленная или подозреваемая наследственная болезнь в семье;
- кровнородственные браки;
- воздействие возможных тератогенов (мутагенов) до или в течение первых трех месяцев беременности;
- значимые отклонения результатов биохимического скрининга маркерных сывороточных белков;
- выявление у плода УЗ-маркеров хромосомных болезней и ВПР.

Последние два показания основаны на результатах пренатальных скринирующих программ по выявлению женщин высокого риска рождения детей с врожденной и наследственной патологией (см. раздел 9.4). Отклонения этих параметров, равно как возраст женщины, наличие хромосомных перестроек у одного из родителей, рождение ребенка с хромосомной патологией или МВПР являются абсолютными показаниями для инвазивной ПД.

Задача врача-генетика в ПД — оценить степень риска врожденной (наследственной) патологии и определить целесообразность инвазивного вмешательства для проведения соответствующих лабораторных исследований в каждом конкретном случае. Для решения этого вопроса врач-генетик ПД пользуется стандартными методами медицинской генетики. Основное внимание уделяется традиционному клинико-генеалогическому методу с обязательным подробным анализом родословной каждой семьи. В зависимости от объема предшествующих клинических и лабораторных обследований и анамнестических данных беременной (или семье) могут быть рекомендованы цитогенетические исследования для уточнения кариотипов родителей, молекулярные — для уточнения природы генного заболевания и типа мутаций, иммунологические — для определения титров антител к вирусам краснухи, герпеса, цитомегаловирусу или к возбудителю токсоплазмоза.

К сожалению, как показывает наш опыт, проведение всех перечисленных и других параклинических исследований во время беременности, как правило, занимает много времени и нередко может вести к задержке проведения инвазивной ПД. В этой связи становится очевидной важность *проспективного медико-генетического консультирования*, то есть до беременности или на самых ранних ее сроках. Именно до беременности целесообразно исследовать кариотипы родителей на предмет наличия сбалансированных хромосомных перестроек, уточнить молекулярную природу мутаций в семьях высокого риска той или иной моногенной болезни, проводить ДНК-анализ на наличие основных мутаций, сопряженных с наиболее частыми генными болезнями (муковисцидоз, фенилкетонурия, спинальная амиотрофия Вердника–Гоффмана и др.). Весьма желательно информировать супругов о мерах *преконцепционной (до зачатия) профилактики* врожденной и наследственной патологии. Наконец, безусловно, полезно именно до беременности или на ее самых ранних сроках обсудить с врачом-генетиком целесообразность и объем *«Генетической карты репродуктивного здоровья»*, суммирующей основные особенности генома обоих супру-

гов, с учетом которых можно избежать самых разных осложнений и заболеваний, зачастую сопутствующих беременности (см. главу 11).

Важной для прогноза здоровья потомства является информация о лекарственных препаратах и потенциально опасных для плода промышленных вредностях, действующих до и во время беременности. Список уже известных тератогенов (экзогенных факторов, вызывающих нарушения развития плода) приведен в таблице 9.3. В него включены опасные для плода заболевания матери, в том числе и инфекционные, некоторые промышленные вредности, фармакологические препараты, а также вредные привычки (прием алкоголя, наркомания, курение). Естественно, что такая информация должна быть доступна и принята во внимание еще до наступления беременности, то есть быть предметом проспективного консультирования.

Таким образом, медико-генетическое консультирование в ПД имеет свою специфику, которая сводится к следующим основным положениям:

Таблица 9.3. Экзогенные факторы, тератогенные для плода человека

Химические вещества и лекарственные препараты	Инфекционные болезни
Противоопухолевые препараты Антиметаболиты Гормоны (андрогены) Диэтилстильбэстрол Талидомид Противосудорожные препараты Органические соли ртути	Цитомегаловирус Парвовирус В-19 Краснуха Токсоплазмоз Сифилис Вирус герпеса
Метимазол Миноксидил Ретиноевая кислота Избыток витамина А Препараты вальпроевой кислоты Варфарин Тетрациклин Стрептомицин Триметадион Алкоголь Кокаин Аминогликозиды Полибифенилы Эретинат	Болезни матери
	Аутоиммунные заболевания Сахарный диабет Эпилепсия Фенилкетонурия Вирилизующие опухоли Гипотиреоз
	Физические воздействия
	Все виды ионизирующего излучения Гипертермия Механические нарушения

— необходимость оценки риска рождения больного ребенка на основании генеалогического анализа супругов и их ближайших родственников, с учетом анамнестических данных и всех имеющихся результатов параклинических исследований (цитогенетических, молекулярных, серологических, иммунологических и пр.), а также результатов биохимического и УЗ-скринингов;

— ограниченные оптимальными сроками инвазивных процедур временные возможности проведения дополнительного (цитогенетического, молекулярного и др.) обследования супружеской пары;

— отсутствие необходимости обязательного медико-генетического консультирования до проведения инвазивной ПД для женщин, заведомо относящихся к группам высокого риска по врожденной и наследственной патологии (см. раздел 9.5);

— целесообразность консультации по результатам ПД в случаях выявления наследственной (генной или хромосомной) или врожденной патологии у плода с целью оказания максимально полной и объективной информационно-помощи семье в принятии решения в отношении данной беременности, а также по прогнозу здоровья будущего потомства;

— тщательный поиск дополнительных медико-генетических данных, которые могут повлиять на выбор правильной тактики ПД в случае неоднозначных для принятия решения результатов биохимического и УЗ-скринингов;

— оценка возможного повреждающего действия факторов внешней среды, в том числе заболеваний матери, инфекций, лекарственных препаратов, вредных привычек родителей, промышленных и сельскохозяйственных ядов на плод.

С учетом всех перечисленных особенностей, становится очевидным, что медико-генетическое консультирование как способ профилактики врожденной и наследственной патологии особенно эффективно до зачатия или на самых ранних сроках беременности, то есть на этапе первичной профилактики.

9.4. Скринирующие методы исследования состояния плода

В комплексе мероприятий по ранней профилактике инвалидизирующих болезней большое внимание уделяется пренатальным скринирующим программам.

Основная цель пренатального скрининга — выявление женщин групп высокого риска рождения детей с ВПР и наследственными болезнями, требующих более детального анализа состояния плода с помощью специальных лабораторных методов исследования.

Согласно рекомендациям Европейской ассоциации перинатальной медицины [749], существует 5 видов пренатального скрининга.

1. Ультразвуковой скрининг.
2. Биохимический скрининг маркерных белков в сыворотке крови беременной.
3. Цитогенетический скрининг.
4. Молекулярный скрининг.
5. Иммунологический скрининг.

Ни одна из этих программ не является универсальной, т. е. не может одновременно учесть все факторы — как экзогенные, так и эндогенные, влияющие на возникновение врожденной и наследственной патологии. Результат любого первичного скрининга носит вероятностный характер и фактически сводится к расчету риска рождения ребенка с той или иной патологией. Преследуя главную цель — выявление беременных, имеющих высокий риск рождения детей с тяжелыми, не корригируемыми пороками развития — каждая из программ пренатального скрининга решает свои специфические задачи при помощи своих специальных методов и приемов.

9.4.1. Ультразвуковой скрининг

Ультразвуковое исследование — основной прямой неинвазивный метод ПД, высокоэффективно выявляет врожденные пороки развития плода и по данным ВОЗ безвреден для плода и матери.

УЗИ, проведенное в адекватные сроки и в соответствии с существующими протоколами, позволяет выявить 80–98 % плодов с анатомическими пороками. В настоящее время метод широко используется для скрининга патологии беременности и для ПД, в том числе для выявления женщин групп высокого риска хромосомной патологии у плода.

В соответствии с рекомендациями Европейской ассоциации перинатальной медицины [179] принята следующая стратегия.

Каждой беременной рекомендовано трех-, четырехкратное УЗИ плода. Цель исследования на уровне 1 — оценка общего анатомического строения плода, его соответствия сроку беременности, опреде-

ление числа плодов, расположения плаценты и объема околоплодных вод. Основная задача — определение нормы или наличия отклонений от нормы. Так как УЗИ 1-го уровня предполагает общее акушерское УЗИ, оно выполняется врачами женских консультаций, хозрасчетных поликлиник и центров, осуществляющих ведение беременных, а также гинекологических стационаров.

Специализированное пренатальное ультразвуковое исследование (*уровень 2*), направлено на детальное исследование анатомии плода для выявления любых видов нарушений развития и проведения всеобъемлющей синдромальной диагностики. Задача исследования на этом уровне — разрешение всех вопросов относительно наличия или отсутствия нарушений развития плода, обнаруженных при исследовании на 1-м уровне. Исследования второго уровня выполняют врачи, прошедшие специализацию в области пренатальной диагностики врожденных нарушений развития плода (специализированные учреждения или отделения).

Беременные групп высокого риска должны быть определены на первом уровне ультразвукового скрининга и более детально обследованы на втором уровне.

Обследованию на *3-м уровне* подлежат беременные с неоднозначными результатами, полученными на предыдущих уровнях, особенно при подозрении на аномалии развития сердечно-сосудистой и нервной систем у плода. Экспертное пренатальное ультразвуковое исследование выполняется с целью постановки окончательного диагноза и способствует определению оптимальной тактики дальнейшего ведения беременности. Исследования на этом уровне должны выполнять врачи УЗИ, прошедшие специализацию в области пренатальной диагностики врожденных нарушений развития плода и имеющие опыт использования новейших технологий и специальных методов исследования (доплерометрия, эхокардиография, нейросонография). Оценка результатов исследования на 3-м уровне должна проводиться совместно с генетиками, неонатологами, педиатрами, детскими хирургами, кардиологами и другими специалистами.

Для достижения максимальной эффективности необходимо *трехкратное ультразвуковое исследование беременных*: в 10–14 недель, 20–24 недели и 32–34 недели беременности. Соответственно каждому сроку разработаны четкие указания объема УЗИ, цели и задачи, рекомендации по дальнейшему ведению беременности при наличии ВПР

и других отклонений от нормального развития [133, 197]. Российской ассоциацией врачей УЗД разработаны и приняты единые протоколы УЗИ для каждого триместра беременности [133]. Такой трехэтапный УЗ-контроль позволяет наиболее полно и своевременно выявить пороки развития плода и маркеры хромосомной патологии у плода.

На первом этапе (10–14 недель) устанавливается срок и характер течения беременности. Уже в этот период принципиально возможно диагностировать ряд тяжелых пороков развития плода (анэнцефалия, акrania, некоторые пороки развития конечностей и др.). Определяются и два важных маркера хромосомной патологии — утолщение воротникового пространства и задержка оссификации носовой кости. Подробно прогностическая значимость этих, а также некоторых других маркеров хромосомных болезней, используемых для формирования групп риска при скрининговых УЗИ в первом триместре, рассмотрена в главе 8.

На втором этапе (20–24 недели) проводится детальная оценка анатомических структур плода для обнаружения у него пороков развития, маркеров хромосомной патологии, ранних форм задержки развития плода, патологии плаценты и пуповины, аномального количества околоплодных вод. При наличии отклонений в этих характеристиках беременная направляется на 3-й уровень УЗИ, при котором плод изучается на аппаратах высокого разрешения не только для диагностики анатомических пороков, но и с целью выявления стойких функциональных нарушений. Основное внимание обращается на аномалии мозга, сердца, плаценты. Помимо обычного ультразвукового сканирования для выявления пороков этих органов, высокоинформативным является применение метода доплерометрии и цветного доплеровского картирования.

Во II триместре выявляется подавляющее большинство пороков развития. Так, эффективность диагностики гастрошизиса составляет 95 %, расщелин лица 77,3 %, агенезии почек 73 %, пороков развития легких 64 %. Наибольшие трудности составляет диагностика пороков развития сердца, а также атрезии пищевода: 39,3 и 40 % соответственно.

Огромное значение для рекомендаций по тактике ведения беременности имеют выявляемые во II триместре маркеры хромосомной патологии, такие как аномальная форма головки плода, дефекты лица и шеи, вентрикуломегалия, кисты сосудистых сплетений головного мозга, гиперэхогенные включения в желудочках сердца, гиперэхоген-

ный кишечник, пиелозктазия, укорочение трубчатых костей, задержка внутриутробного развития плода, генерализованный отек плода, единственная артерия пуповины. Каждое из этих отклонений в развитии плода, а также их различные сочетания с той или иной вероятностью могут быть обусловлены хромосомной патологией. Подробнее тема УЗМ, регистрируемых при скрининговых исследованиях во II триместре беременности, обсуждалась в главе 8.

На третьем этапе обследования (32–34 недели) проводится оценка темпов роста плода и выявление пороков с поздней манифестацией. УЗИ в эти сроки позволяет уточнить состояние систем жизнеобеспечения плода (сердце, плацента, пуповина, оболочки). Полученная в эти сроки беременности информация в ряде случаев принципиально важна для решения вопроса о возможной оперативной коррекции некоторых пороков, а также выработки стратегии и тактики родоразрешения. За исключением редких случаев, УЗИ в эти сроки не влечет за собой рекомендации по пренатальному кариотипированию. Впервые выявленные в этот период пороки развития свидетельствуют об ошибках организации УЗ-компоненты всей службы ПД. Подробнее проблемы инвазивной ПД в III триместре будут рассмотрены нами в разделе 9.12.

Наличие грубых, не совместимых с жизнью анатомических пороков, выявленных при УЗ-скрининге, является достаточным основанием для рекомендации о прерывании беременности независимо от ее срока. Вместе с тем, УЗ-скрининг только констатирует факт наличия нарушения, но не вскрывает его причину. Соответственно и тактика ведения беременности должна определяться не только тяжестью выявленного порока, но и тем, имеет он экзогенную или эндогенную (наследственную) этиологию. Для исключения последней, по крайней мере, на уровне хромосомного дисбаланса, ультразвуковое сканирование должно быть дополнено анализом кариотипа плода. Этот этап обследования особенно важен для выбора тактики ведения беременности и оптимального способа родоразрешения, а также метода лечения новорожденного в случаях наличия пороков, которые совместимы с жизнью и могут быть успешно корригированы после рождения у ребенка с нормальным кариотипом.

Следует, однако, помнить, что стремление к проведению первого этапа УЗ-скрининга в конце 14-й недели беременности, когда уже возможна точная диагностика целого ряда пороков, приводит к смещению сроков инвазивной пренатальной диагностики во II триместр.

Аналогичная тенденция прослеживается и в организации скрининга во II триместре. УЗИ, выполненное на 24-й неделе беременности, автоматически перемещает сроки инвазивных вмешательств в III триместр. Поэтому УЗ-скрининг, безусловно, эффективный для диагностики ВПР, вряд ли можно отнести к методу ранней профилактики хромосомных болезней.

9.4.2. Биохимический скрининг

Биохимический скрининг для формирования групп риска рождения ребенка с некоторыми пороками развития и хромосомными болезнями основан на иммуноферментном анализе специфических белков в сыворотке крови беременной. К таким маркерным сывороточным белкам (МСБ), которые тестируются при беременности, относятся эмбрионспецифичные белки, которые либо продуцируются клетками плода или плаценты и поступают в кровоток матери, либо ассоциированы с беременностью. Их концентрация в сыворотке крови изменяется в зависимости от срока беременности и от состояния плода.

Общепринятым обозначением отклонений уровня МСБ является отношение величины содержания МСБ в крови конкретной женщины к усредненной величине (медиане) содержания данного белка при нормальной беременности этого срока у многих женщин. Кратность медиане выражается в МоМ (multiples of median). Например, уровень АФП = 2,5 МоМ означает, что содержание белка в сыворотке крови у данной беременной в 2,5 раза выше, чем медиана (норма) для этого срока беременности. Нормальными в диагностические сроки считаются колебания уровня белков от 0,5 до 2 МоМ. Кривые содержания маркерных сывороточных белков в разные сроки беременности рассмотрены в соответствующих методических рекомендациях [151, 197].

Обширный фактический материал о динамике изменения этих маркерных белков в норме и при различной патологии плода, с одной стороны, продемонстрировал полезность анализа МСБ и целесообразность его массового использования для формирования групп риска по рождению детей с патологией и для профилактики акушерских осложнений. С другой стороны, установленное влияние множества факторов на уровень этих белков потребовало объективизации данных. Поэтому были разработаны и используются специальные программы пренатального биохимического скрининга, заключительным этапом кото-

рых является автоматический расчет риска рождения ребенка с болезнью Дауна или врожденными пороками развития. Базовыми параметрами в этих расчетах являются возрастная риск и степень отклонений тестируемых белков. Величина риска, определенная по результатам биохимического скрининга, служит рекомендацией для направления беременной на дополнительное обследование.

9.4.2.1. Биохимический скрининг во II триместре беременности

К МСБ, которые тестируются во II триместре (15–18 недель), относятся **альфафетопротеин (АФП)**, **хорионический гонадотропин человека (ХГЧ)**, **свободный (неконъюгированный) эстриол (НЭ)**, **ингибин А** и некоторые другие.

АФП вырабатывается желточным мешком, затем печенью плода, экскретируется в амниотическую жидкость с мочой плода, проникает в кровь матери через плаценту. Белок выявляется в сыворотке крови матери начиная с 5–6 недель. Его концентрация повышается от 5–6 до 150–200 нг/мл в течение беременности. Открытые дефекты зародыша нервной трубки (ДЗНТ), такие как анэнцефалия или открытая спинно-мозговая грыжа (*spina bifida*) ведут к излитию фетальной жидкости в амниотическую полость, вследствие чего концентрация АФП в крови матери резко — в 5–10 раз — возрастает. Повышение уровня АФП регистрируется и при других патологических состояниях плода (гастрошизис, омфалоцеле, аномалии почек), а также при угрозе прерывания беременности и пр. В то же время, примерно в 30% случаев синдрома Дауна у плода, а также при триплоидии, уровень АФП в эти диагностические сроки оказывается сниженным.

ХГЧ — гликопротеин, состоящий из двух субъединиц — альфа и бета, секретруется клетками трофобласта, выявляется в сыворотке крови беременной, начиная с 10–12-го дня после оплодотворения, т. е. на 3–5-й день после имплантации. Его концентрация быстро нарастает и достигает максимума к 8–11 неделям беременности. Уровень ХГЧ при угрозе прерывания беременности, а также при синдроме Дауна у плода обычно повышается, а при синдроме Эдвардса и триплоидии — снижается.

НЭ — стероидный гормон, продуцируется фетоплацентарным комплексом, печенью плода и надпочечниками, проникает в материнский кровоток. Неконъюгированная форма лучше характеризует состояние

фетоплацентарного комплекса, чем общий эстриол. В норме уровень НЭ нарастает от 4 нмоль/л в 15 недель беременности до 40 нмоль/л к родам. По концентрации НЭ в сыворотке крови беременной можно судить о функциональном состоянии плаценты и плода. Сниженный уровень НЭ наблюдается при врожденной гиперплазии коры надпочечников, при дефиците плацентарной сульфатазы, анэнцефалии, некоторых хромосомных болезнях (Дауна, Эдвардса), внутриутробной инфекции, при угрозе прерывания беременности.

Ингибин А — гетеродимерный гормон белковой природы, синтезируется плодом, плацентой, плодными оболочками и яичниками. Уровень ингибина А нарастает до 10 недель, затем снижается, держится на одном уровне до 25 недель и достигает максимума перед родами. При болезни Дауна у плода содержание ингибина А в сыворотке крови матери во втором триместре беременности повышается почти вдвое. При нормальном кариотипе плода отклонения уровня ингибина А указывают на повышенный риск преэклампсии.

Скрининг проводится путем тестирования сразу трех МСБ («тройной тест») или только двух из них — АФП и ХГЧ («двойной тест»). Эффективность биохимического скрининга при исследовании трех белков по сравнению с определением двух маркерных белков повышается на 4–5%. В настоящее время существует quadro-тест (АФП, ХГЧ, НЭ и ингибин А), при котором одновременно формируется группа риска хромосомных болезней у плода и беременных с риском преэклампсии.

Схема обследования для выявления беременных групп высокого риска рождения плодов с ДЗНТ или хромосомными болезнями во II триместре беременности приведена на рисунке 9.2. Самой распространенной ошибкой при оценке результатов скрининга является неверный расчет срока беременности, поэтому при несоответствии уровня белка норме необходимо, в первую очередь, уточнить срок беременности с помощью УЗИ.

В случае высокого риска ДЗНТ у плода показано ультразвуковое сканирование в динамике. При отклонениях маркерных белков, свидетельствующих о вероятности хромосомной болезни у плода, рекомендуется инвазивная пренатальная диагностика с целью кариотипирования плода. Пороговый уровень (англ. cut off) для инвазивной ПД, соответствующий риску рождения ребенка с болезнью Дауна, варьирует в диапазоне 1/360 — 1/250. Пороговый уровень определяется диа-

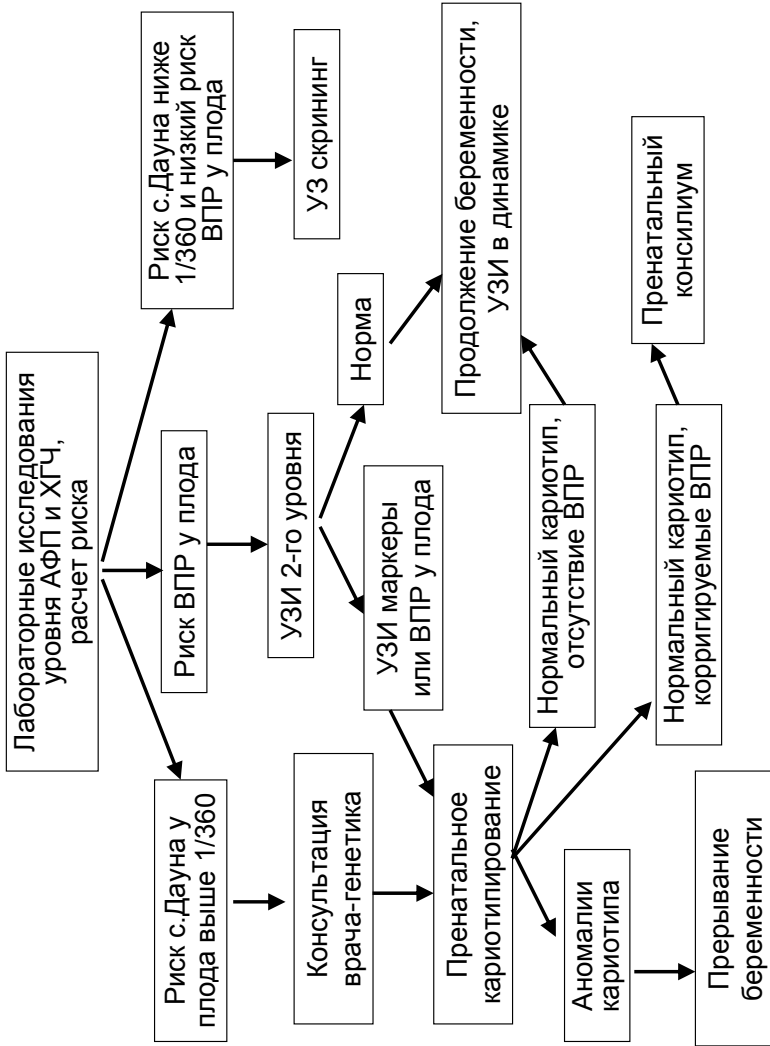


Рис. 9.2. Алгоритм биохимического скрининга во II триместре беременности

гностическими возможностями и пропускной способностью каждого центра, так как при массовом скрининге (охват не менее 80 % всех беременных) группа риска, которой будет рекомендовано пренатальное кариотипирование, составляет обычно более 5 % от всех обследованных. Немаловажным для выбора порога является и риск послеоперационных осложнений, который не должен превышать риск рождения ребенка с болезнью Дауна, определенный по результатам биохимического скрининга.

Полезность биохимического скрининга определяется его эффективностью. Так, с его помощью удается выявить до 98 % плодов с пороками нервной системы и 60–70 % — с болезнью Дауна. Однако биохимический скрининг обладает высокой чувствительностью и низкой специфичностью, поэтому болезнь Дауна у плода подтверждается только в 1 из 50, а ДЗНТ — в 1 из 400 случаев патологически измененных МСБ. Поэтому следует еще раз подчеркнуть, что *положительные результаты скрининга (значимые отклонения уровня белков от медианы) являются не диагнозом патологии у плода, а лишь сигналом к углубленному обследованию плода и самой беременной.*

9.4.2.2. Биохимический скрининг в I триместре беременности

Биохимический скрининг основан на тестировании содержания в крови беременной белков **PAPP-A** (pregnancy associated plasma protein A) и **свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина (ХГЧ)**.

Белок PAPP-A — гликопротеин, входящий в состав димерного белкового комплекса, который секретируется трофобластом и децидуальными клетками на протяжении всей беременности (от момента имплантации до родов). Предполагается, что ему принадлежит важная роль в регуляции процессов клеточного роста и межклеточных контактов между клетками трофобласта и децидуальной ткани. Содержание белка увеличивается по мере прогрессирования беременности. При трисомиях 21 и 18 у плода уровень маркера в крови беременной снижается.

Свободная бета-субъединица хорионического гонадотропина продуцируется клетками трофобласта. Концентрация свободной бета-субъединицы в крови беременной очень низка и составляет только 1–3 % общего содержания ХГЧ, снижаясь к концу беременности до

0,5 %. При беременности, осложненной синдромом Дауна у плода или преэклампсией, а также при трофобластических болезнях содержание свободной бета-субъединицы возрастает.

Схема обследования беременной в I триместре для оценки риска хромосомной патологии (болезни Дауна) у плода приведена на рисунке 9.3.

При расчете риска учитываются как уровни содержания PAPP-A и свободной бета-ХГЧ в сыворотке крови беременной, так и результаты УЗ-исследования плода. При этом основное внимание обращается на такие показатели как копчико-теменной размер, толщина воротникового пространства (ТВП), число плодов, наличие и размер носовой косточки, вес женщины, ее расовая принадлежность и некоторые анамнестические данные (рождение детей с болезнью Дауна, наличие сахарного диабета).

Таким образом, отличительной особенностью биохимического скрининга в первом триместре беременности является расчет риска с обязательным учетом данных УЗИ плода. На большом клиническом материале показано, что при учете показателей содержания в сыворотке крови матери этих МСБ в сочетании с данными УЗ-обследования плода в 10–13 недель беременности (толщина воротникового пространства, длина носовой кости) выявляемость хромосомной патологии может достигать 95–98 %, то есть соответствовать или даже превышать таковую (75 %) во II триместре беременности.

Мы вернемся к рассмотрению проблем ПД в I триместре беременности в заключительном разделе данной главы.

9.4.3. Цитогенетический скрининг

Исходя из непреложных фактов, что исключительное большинство геномных мутаций возникают *de novo*, каждую беременность можно рассматривать как ситуацию риска рождения ребенка с хромосомной болезнью. Трудоемкость цитогенетических методов делает массовое пренатальное кариотипирование нереальным, а с учетом определенного, хоть и небольшого, риска инвазивных манипуляций с целью получения плодного материала, вредным.

Фундаментальной основой цитогенетического скрининга является определение риска хромосомной патологии у плода в зависимости от возраста беременной и семейного репродуктивного анамнеза. Последний включает наличие у супружеской пары ребенка

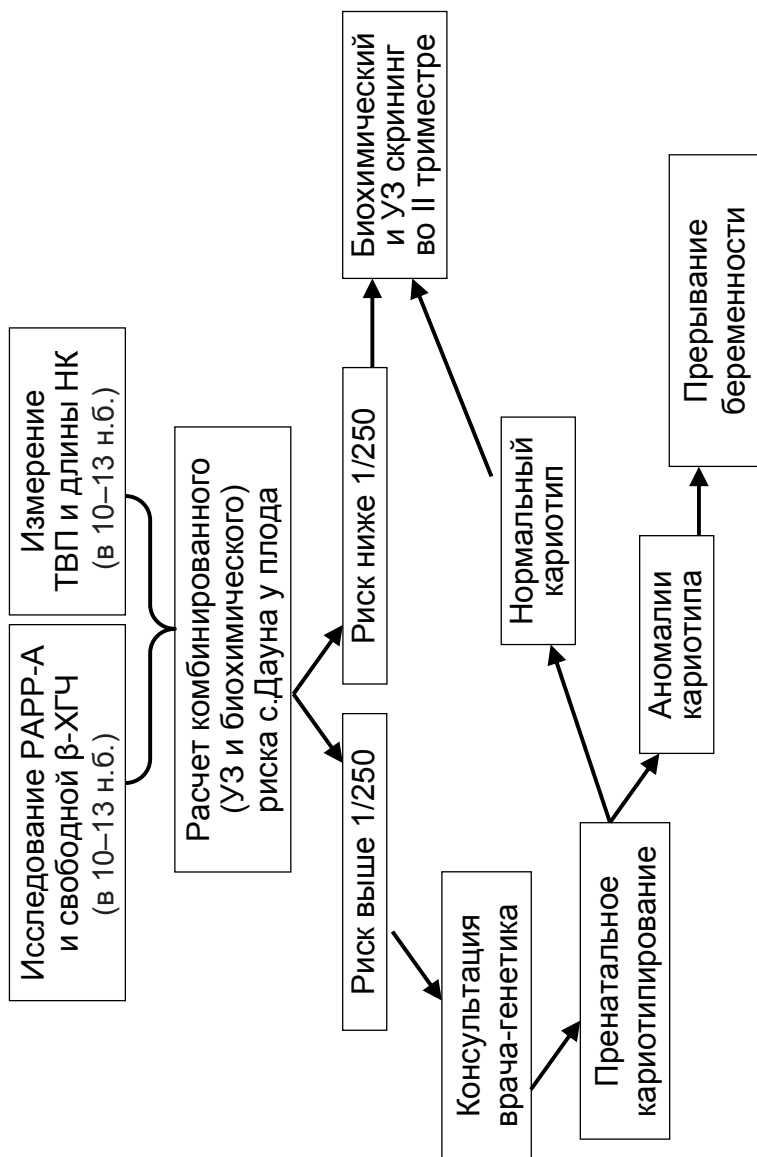


Рис. 9.3. Алгоритм обследования беременной в I триместре

с хромосомной болезнью или множественными пороками развития, а также носительство хромосомной аберрации одним из супругов. **Основной целью цитогенетического скрининга является поиск супружеских пар, а priori имеющих повышенный риск образования несбалансированных гамет и зигот.** В осуществлении этого вида пренатального скрининга могут и должны принимать участие врачи любой специализации, однако ведущая роль в расчете индивидуального риска принадлежит врачу-генетику.

Цитогенетический скрининг вместе с биохимическим и ультразвуковым представляет триаду программ, имеющих непосредственное отношение к формированию групп высокого риска хромосомных болезней у плода. К сожалению, биохимическому и ультразвуковому скринингу отводится ведущая роль, а значимость цитогенетического скрининга как одного из самостоятельных направлений профилактики хромосомной патологии практически полностью игнорируется. Вместе с тем, по конечным целям скринирующего исследования — расчет индивидуального риска рождения ребенка с хромосомной болезнью — цитогенетический скрининг принципиально не отличается от ультразвукового или биохимического. Его специфика заключается в том, что вероятность хромосомной патологии у плода рассчитывается независимо от данных о его состоянии, тогда как риск при других типах скрининга исчисляется по результатам биохимических и/или биофизических исследований при настоящей беременности. Цитогенетический скрининг может осуществляться в любой срок беременности и даже до ее наступления. Однако, принимая во внимание пониженную жизнеспособность плодов с хромосомным дисбалансом, очевидно, что эффективность диагностики в группах риска, сформированных при цитогенетическом скрининге, будет снижаться по мере прогрессирования беременности.

Понятие «цитогенетический пренатальный скрининг» зачастую подменяется понятием «цитогенетическая пренатальная диагностика». Между тем, это далеко не синонимы. Так, если цель скрининга — это определение индивидуального риска хромосомной патологии у плода, то цитогенетическая пренатальная диагностика — это часть комплекса лабораторно-диагностических исследований, сопровождающих инвазивные внутриматочные вмешательства с целью получения плодного материала. Строго говоря, цитогенетическая пренатальная диагностика — это кариотипирование плода в разных группах риска, определенных по резуль-

татам трех программ пренатального скрининга — цитогенетического, ультразвукового и биохимического. Полный перечень показаний к пренатальному кариотипированию приведен в разделе 9.5.

Рассмотрим подробнее принципы формирования групп риска хромосомных болезней у плода при цитогенетическом скрининге.

9.4.3.1. Скрининг по возрасту

Скринингу на синдром Дауна по возрасту можно отвести роль родоначальника пренатальных скринирующих программ. Основы и принципы этого скринингового исследования изложены ранее [133]. Принимая во внимание доступность осуществления этого типа скрининга, представляется целесообразным остановиться подробнее на проблемах организации и эффективности пренатального скрининга у женщин разных возрастных категорий.

Фундаментом этого скрининга служит аксиома, что каждая беременность может завершиться рождением ребенка с синдромом Дауна и некоторыми другими хромосомными болезнями, однако, вероятность такого события от пубертата до менопаузы (15–45 лет) у одной и той же женщины, независимо от числа рожденных ею за этот период детей, меняется. На основе многочисленных наблюдений о частоте рождения детей разработаны и широко используются при медико-генетическом консультировании различные таблицы, в которых данные о риске для каждой возрастной категории могут заметно варьировать. Причиной этих погрешностей является снижение вероятности рождения больного ребенка за счет гибели 50–99% плодов с хромосомной патологией по мере прогрессирования беременности. Например, вероятность обнаружения трисомии 21 у плода в 9–14 недель у 35-летней женщины составляет 1/175, в 15–20 недель — 1/258 и на момент родов — 1/385 [178]. Аналогичная тенденция наблюдается в отношении трисомии 21 и в других возрастных группах. Парадоксально, но общая частота хромосомной патологии, согласно полученным нами результатам пренатальной диагностики, в I и II триместрах практически не меняется (см. главу 5). Если же рассматривать эту частоту в пределах возрастных групп, например, в группе беременных старше 39 лет, то результативность пренатального кариотипирования в I триместре (7,3%) действительно оказывается в 1,5 раза выше, чем во II (5,0%) (табл. 9.4, группы 3 и 2 соответственно).

Таблица 9.4. Результаты пренатального карiotипирования в I и II триместрах беременности в разных возрастных группах за 2002–2003 гг. (собственные данные)

Характеристика группы	Риск синдрома Дауна по результатам биохимического скрининга	Численность группы	Выявлено хромосомной патологии у плода	
			Всего, %	С трисомией 21, %
1 < 39 лет	> 0,5	435	10* (2,3 %)	7** (1,6 %)
2 ≥ 39 лет, II триместр, всего в т.ч. риск:		411	21 (5,1 %)	13 (3,2 %)
2а) ≥ возрастного	> 0,5	20	3 (15,0 %)	2 (10,0 %)
2б) ≤ возрастного	< 0,5	49	1 (2,0 %)	0 (0 %)
2в) только возрастной	нет данных	342	17 (5,0 %)	11 (3,2 %)
3 ≥ 39 лет, I триместр (только возрастной риск)		232	17 (7,3 %)	10 (4,3 %)

* В том числе 4 у беременных 35–38 лет.

** В том числе 3 у беременных 35–38 лет.

Поэтому при определении риска хромосомных болезней в рамках пренатального скрининга по возрастному фактору корректно использовать только те таблицы, в которых учитывается срок беременности на момент консультирования [178, 749].

Рассматривая скрининг по возрасту в качестве классического примера скрининговой программы, в первую очередь необходимо определить границу, разделяющую беременных на группы высокого и низкого возрастного риска. Известно, что экспоненциальный рост рождения детей с синдромом Дауна отмечается у женщин с 35-летнего возраста. Поэтому именно этот возраст повсеместно признан критическим («переломным») в плане риска синдрома Дауна у плода. Однако как пограничное значение (cut off в рамках скрининга) для разделения на группы высокого и низкого риска возраст беременных варьирует в разных странах от 34 до 40 лет. Политика пренатального скрининга по возрасту определяется уровнем финансирования всей службы пренатальной диагностики и предполагает, в основном, скрининг на синдром Дауна как наиболее социально-значимой патологии. При этом необходимо помнить, что чувствительность скрининга (т. е. выявляемость патологии при избранном значении cut off)

зависит от возрастного состава всех беременных в регионе, однако на возрастную категорию беременных старше 35 лет придется не более 30 % всех случаев синдрома Дауна. Напомним также, что в отличие от трисомии 21, имеющей экспоненциальную возрастную зависимость, частота трисомий 16, 13 и 18 растет линейно с возрастом матери, а такие геномные мутации как триплоидия, моносомия X, а также более редкие трисомии по хромосомам групп А, В и С вообще не являются возрастзависимыми [395, 514]. Очевидно, что сдвиг порога риска к концу репродуктивного возраста приведет к снижению уровня ложноположительных результатов, однако в целом не решит проблему профилактики хромосомной патологии.

Проиллюстрируем эти положения на примере статистических данных по Санкт-Петербургу. Так, за период 1987–2003 годы в нашем городе наблюдалась не только динамика числа новорожденных, но и перераспределение возрастной структуры их матерей. Основная тенденция — ежегодное существенное снижение общего числа родов с 76 тыс. в 1987 году до 32 тыс. в 1993 году и незначительном росте до 42 тыс. к 2003 году В периоды снижения (1988–1993 годы) и стабилизации (1994–1997 гг.) рождаемости изменение возрастной структуры матерей происходило исключительно за счет перераспределения численности родов в «младших» (до 24 лет) и «средних» (25–34 года) группах. Доля матерей 35–39 лет колебалась в пределах 1 % (6,1–7,0 % от всех родивших), а в возрасте ≥ 40 лет — оставалась практически постоянной (1,1–1,4 %) [141]. Частота рождения детей с синдромом Дауна за эти годы постепенно снижалась — с 1,34 до 0,87 %, с другими хромосомными болезнями — с 0,18 до 0,12 % [197]. Сокращение рождаемости детей с хромосомной патологией было достигнуто преимущественно за счет прерывания беременности по результатам ПД у женщин старше 35 лет (табл. 9.5). Однако в целом возрастная структура матерей, родивших детей с синдромом Дауна и другими хромосомными болезнями, практически не изменилась. Так, частота рождения детей с синдромом Дауна у матерей ≥ 39 лет по-прежнему остается самой высокой (1,13 %), а на долю матерей «старшей» возрастной группы ≥ 35 лет приходится 34 % (54 из 159) всех детей с синдромом Дауна, родившихся в Санкт-Петербурге в 2000–2003 гг. (табл. 9.5).

Группа «возрастных» беременных, направляемых на инвазивную пренатальную диагностику, является одной из самых многочисленных.

Таблица 9.5. Вклад пренатальной диагностики в частоту рождаемости детей с синдромом Дауна в Санкт-Петербурге (по данным мониторинга за 2000–2003 гг.)

Возрастная группа	Новорожденные с синдромом Дауна *		Прервано беременностей по результатам ПД
	число	частота, %	
≥ 19 лет	11	0,096 ± 0,029	0
20–24 года	34	0,065 ± 0,011	3
25–29 лет	30	0,061 ± 0,011	7
30–34 года	30	0,118 ± 0,022	7
35–38 лет	18	0,196 ± 0,046	9
≥ 39 лет	36	1,13 ± 0,193	32
Итого	159	0,104 ± 0,008	58

* См. [197].

Однако ее удельный вес в общей структуре показаний к инвазивной ПД может варьировать в широком диапазоне (34–83 % от всех диагностик) [271, 287, 816, 887], что связано не столько с возрастным составом беременных в регионе, сколько с избранным в качестве порога возрастным риском. В частности, доля «возрастных» беременных среди всех цитогенетических пренатальных диагностик, выполненных в Санкт-Петербурге, составляла 75 % при cut off = 35 лет и 50 % при cut off = 39 лет. При этом инвазивная ПД осуществлялась в 2000–2004 годы не более чем у 1,5 % всех беременных «старшей» возрастной группы ≥ 35 лет.

Значение порогового риска (в данном случае возраст беременной) определяет не только численность группы высокого риска, но и эффективность пренатального кариотипирования.

Так, суммарная частота выявленной пренатально хромосомной патологии в группе беременных старшего репродуктивного возраста (≥ 35 лет), согласно нашим данным, составляет 4,25 % (173 из 4068). Большинство хромосомных аномалий представлено анеуплоидиями, среди которых лидирует трисомия 21, на долю которой приходится 54 % всех аномалий (93 случая). При этом в группе 35–38-летних (1568 беременных) зарегистрировано 46 хромосомных патологий (24 из них — трисомия 21), а в группе 39 лет и старше (2500 беременных) — 127 (69 — трисомия 21). Общая эффективность пренатальной диагностики хромосомных болезней в этих группах составила соответственно 2,9 и 5,1 %, синдрома Дауна — 1,5 и 2,8 %. Интересно от-

метить, что в возрастном диапазоне 35–38 лет почти половина всех случаев хромосомной патологии у плода (22 случая из 46) и более 2/3 — с трисомией 21 (17 из 24) оказалась у 37-летних беременных. По общей эффективности диагностики (22 случая из 405, т. е. 5,4%), эта возрастная категория не отличается от женщин в возрасте 41 года (23 из 457, т. е. 5,0%), а по частоте синдрома Дауна у плода даже ее превосходит (17 и 14 случаев, или 4,2 и 3,1% из всех диагностик в возрастной группе соответственно). Эти данные в целом согласуются с результатами десятков тысяч пренатальных диагностик, выполненных в различных лабораториях мира. Сравнивая данные разных центров, уместно напомнить, что ведущим методом ПД хромосомных болезней в зарубежных странах, например, во Франции, является амниоцентез (II триместр беременности), тогда как на долю хорионбиопсий в I триместре беременности приходится 5–6% инвазивных вмешательств. Частота хромосомной патологии у плодов (возраст беременной > 38 лет) на 80 795 исследований составила 3,2% [376]. В нашей работе предпочтение отдается кариотипированию по клеткам цитотрофобласта. При этом 30–40% диагностик проводится до 14-й недели беременности, а плоды с хромосомной патологией в группе беременных ≥ 35 лет (173 из 4068) встречаются на 30% чаще (см. выше).

Таким образом, частота выявленной хромосомной патологии у плодов в группах возрастного риска может варьировать, что определяется объемом исследований, спецификой выбора возрастных критериев для пренатального кариотипирования, а также сроками беременности, при которых проводится инвазивная ПД. Однако в любом случае, категория беременных старшего репродуктивного возраста является одной из наиболее представительных, а эффективность хромосомной патологии в этой группе не превышает 5%.

Логично предположить, что эффективность пренатальной диагностики хромосомных болезней у беременных группы высокого риска по возрасту можно повысить, используя при расчете риска результаты других типов пренатального скрининга — биохимического и ультразвукового.

Анализ собственных данных (табл. 9.4) показывает, что использование биохимического теста у беременных 39 лет и старше при биохимическом cut off = 0,5 (соответствует риску синдрома Дауна у плода в 15–19 недель беременности при возрасте 35–36 лет) не позволяет

отказаться от пренатального кариотипирования по фактору возраста. Так, при снижении возрастного риска хромосомных болезней у плода в результате нормальных показателей АФП и ХГЧ частота трисомии 21 в этой группе падает, однако остается сопоставимой с таковой у беременных моложе 39 лет (ср. группы 2б и 1, табл. 9.4). При сохранении или увеличении возрастного риска случаи выявления хромосомной патологии, в т. ч. и трисомии 21, учащаются (группа 2а). Следует также отметить, что при изменениях маркерных сывороточных белков, не характерных для синдрома Дауна, невыявленными могут остаться плоды с другой хромосомной патологией. Данные, представленные в таблице 9.4 и на рисунке 6.1, свидетельствуют о том, что такие случаи не так редки. Следует отметить также, что по результатам биохимического скрининга во II триместре в группу высокого риска попадают только 65–70% беременных плодом с трисомией 21 (см. раздел 9.4.2).

Аналогичная ситуация наблюдается и при проведении УЗ-скрининга у возрастных беременных. Так, в группе женщин старше 35 лет из 15 случаев хромосомных болезней увеличение ТВП > 2,5 мм зарегистрировано у 9 плодов, а носовая кость не визуализировалась лишь в 4 случаях. Среди плодов, не имеющих этих УЗМ, в 3 случаях установлена трисомия 21. Таким образом, эффективность скрининга по специфичному для хромосомных болезней УЗМ в I триместре (ТВП) у плода при возрасте матери старше 35 лет составляет всего 60% [130]. Напомним также, что при скрининге во II триместре ультразвуковые маркеры или тяжелые пороки развития обнаруживаются не более чем у 40% плодов с синдромом Дауна [178].

Справедливости ради следует отметить, что результаты комбинированного биохимического и УЗ-скрининга в I триместре беременности позволяют сократить число инвазивных вмешательств у возрастных беременных. Однако приведенные выше данные наглядно иллюстрируют их низкую эффективность и нецелесообразность их массового применения в «старшей» возрастной группе. Скрининговые программы в этой группе лишь сдвигают на более поздние сроки не только пренатальное кариотипирование, но и прерывание беременности, что вряд ли оправданно.

Говоря о возрасте беременной как факторе риска, уместно отметить, что частота рождения детей с хромосомными болезнями, включая синдром Дауна, повышена относительно популяционной и у молодых (до

22 лет) беременных [182, 187, 457]. В Санкт-Петербурге частота новорожденных с синдромом Дауна в 2000–2003 годах у матерей моложе 19 лет составила $0,096 \pm 0,029$, что соответствует таковой у матерей 30–34 лет ($0,118 \pm 0,022$) (табл. 9.5). По результатам пренатального кариотипирования отчетливо прослеживается тенденция к увеличению частоты хромосомной патологии у беременных до 24 лет (рис. 6.1). Следует обратить внимание на существенные различия в численности сравниваемых возрастных групп (по числу новорожденных и по числу пренатальных диагностик на группу), что отчасти отражается на частоте хромосомной патологии у потомства.

Вопрос о влиянии возраста отца на возникновение геномных мутаций до сих пор окончательно не решен. Показано, что у пожилых мужчин повышается частота сперматозоидов со структурными аберрациями и дисомией хромосом 1, YY, XX и XY [449, 451]. Однако, если влияние возраста на нерасхождение хромосом в сперматогенезе и существует, то оно в 10–100 раз менее выражено, чем в оогенезе [210]. Поэтому возраст отца обычно не учитывается при определении показаний к кариотипированию плода.

Таким образом, скрининг на хромосомную патологию по возрасту является одним из типов пренатального скрининга. Его достоинство — простота и экономичность. Чувствительность скрининга прямо коррелирует с возрастом, избранным в качестве пограничного значения. При организации скрининга и выборе границы возрастного риска целесообразно учитывать демографическую ситуацию в конкретном регионе, а также детородный потенциал женщин различных возрастных групп, детальное представление о котором дают суммарный и повозрастные коэффициенты фертильности или рождаемости. При оценке эффективности и чувствительности скрининга по возрасту следует учитывать весь спектр выявленной пренатально хромосомной патологии, а не только случаи синдрома Дауна.

9.4.3.2. Наличие ребенка (плода) с хромосомной болезнью в анамнезе

Мнение о целесообразности пренатального кариотипирования в случаях рождения ребенка (или плода) с хромосомной болезнью при нормальных кариотипах у родителей неоднозначно. Однако согласно принятым Европейской ассоциацией перинатальной медицины реко-

мендациям [749], риск повторения анеуплоидии при следующих беременностях оценивается выше, чем средний популяционный. При прогнозировании повторного рождения детей с хромосомными болезнями обычно исходят из родительского происхождения трисомии у первого ребенка. Так как в 70–80% случаев лишняя хромосома имеет материнское происхождение, то повторный риск связывают с возрастным риском пациентки. Так, для матерей моложе 35 лет эмпирический риск составляет около 1%, а в возрасте 35 лет и старше — удвоенный для данной возрастной группы [125]. При этом необходимо делать поправку на то, что кариотип 45,X не связан с возрастом матери, при образовании кариотипа 47,XXY лишняя X-хромосома равновероятно может иметь как отцовское, так и материнское происхождение, а кариотип 47,XYY обусловлен исключительно ошибками в сперматогенезе.

Основываясь на нашем опыте, можно утверждать, что лишь в половине случаев на момент обращения на инвазивную ПД при следующей беременности будут предоставлены сведения о кариотипах больного ребенка и его родителей. В остальных случаях информация окажется ограниченной клиническим диагнозом, установленным при рождении ребенка или при патоморфологическом исследовании. Даже если клинический диагноз подкреплен цитогенетическим заключением, кариотип родителей остается не исследованным. Между тем, для корректного прогноза повторного риска необходимы знания о кариотипе не только ребенка, но и его родителей.

Нередко один из родителей пациентов с хромосомными синдромами оказывается носителем мозаичного кариотипа [655]. В этих случаях риск повторного рождения ребенка с той же хромосомной патологией рассчитывается по формуле $(x/2 - x) \times K$, где x — доля аномального клеточного клона, K — коэффициент элиминации несбалансированной зиготы. Величина K устанавливается на основании соотношения частоты данной трисомии среди абортусов и новорожденных. Для трисомии 21 она равна 0,5, а для трисомий 13 и 18 — 0,25 [74, 125].

Однако многие случаи фенотипически не проявляющегося хромосомного мозаицизма, особенно при малой пропорции аномальных клеток, остаются нераспознанными. Проблему диагностики «скрытого» мозаицизма, т. е. недоступного для выявления при стандартном кариотипировании, иногда удается решить с помощью более чувствительных специальных методов исследования FISH и ПЦР [155]. Известно

также, что мозаичный кариотип может быть ограничен только какой-либо одной тканью (*ограниченный тканевой мозаицизм*) или представлен во всех тканях организма (*генерализованный*, или *истинный мозаицизм*) (см. главу 7). На практике заключение о кариотипе основано на результатах цитогенетического и ДНК-анализа лимфоцитов. Очевидно, что установление характера мозаицизма требует изучения клеток различных тканей, что не представляется возможным. Между тем, для прогноза потомства имеет значение наличие аномального хромосомного клона только в гонадах, т. е. *гонадного мозаицизма*. Прямые доказательства его существования могут быть получены при исследовании хромосомного набора тканей гонад и пулов генеративных клеток. Такие исследования возможны лишь на материале биоптата гонад и на практике не используются. Косвенным доказательством наличия гонадного мозаицизма являются случаи рождения двух и более детей с одной и той же хромосомной патологией у кариотипически нормальных родителей.

Мозаицизм и другие факторы, увеличивающие взятый за основу расчета повторного риска возраст матери, подробно обсуждены нами в главе 6 (см. раздел 6.4 и 6.5). К сожалению, ни для одного из этих факторов не доказана четкая взаимосвязь с возникновением анеуплоидии, и влияние этих факторов рассматривается, в основном, на уровне гипотез. Однако многолетней практикой ПД доказано, что супружеские пары, имеющие детей/плодов с хромосомными болезнями, относятся к семьям высокого риска.

Так, суммарная частота хромосомной патологии, выявленной пренатально в этой группе беременных (без учета их возраста), составила в наших исследованиях 2,6% (13 из 498), в более представительном исследовании — 3,0% (174 из 5792) [376].

Как правило, аномалии кариотипа у sibсов обусловлены анеуплоидией по одним и тем же хромосомам, преимущественно, трисомией 21. Значительно реже встречаются семьи, в которых sibсы являются носителями кариотипов с анеуплоидией по разным хромосомам. Нами зарегистрировано только 3 случая, когда анеуплоидные кариотипы у плодов (или у ребенка и плода) отличались по хромосомам, принимающим в них участие. Следует отметить, что наличие ≥ 2 беременностей, осложненных хромосомной болезнью у плода/ребенка, — явление редкое, но не уникальное. В нашем исследовании таких пациенток, имеющих

в анамнезе рождение ребенка с трисомией 21, оказалось 2. При двух повторных беременностях у одной из них были в результате ПД выявлены разные анеуплоидии (47,XXY,+13 и 47,XXY), у другой — исключительно трисомия 21 у плода. В обоих случаях кариотипы родителей были нормальными. Таким образом, при расчете повторного риска хромосомной болезни необходимо учитывать не только риск конкретной хромосомной аномалии, но и возможность возникновения других анеуплоидий.

Численность категории беременных, имеющих в анамнезе ребенка/плода с установленной цитогенетическими методами хромосомной болезнью, в структуре показаний к инвазивной ПД колеблется в широком диапазоне. Так, удельный вес этой группы в наших исследованиях составил 6%, варьируя от 1 до 8% всех диагностик в год, тогда как в масштабных исследованиях во Франции их доля из 79 000 ПД оказалась равной 2,4% [376]. Следует отметить, что включение в эту категорию женщин с репродуктивным анамнезом, осложненным невынашиванием беременности плодом с хромосомной патологией, может привести к относительному увеличению числа нуждающихся в пренатальном кариотипировании при следующей беременности. Уместно напомнить, что частота и спектр хромосомных аномалий у спонтанных абортусов отличается от таковых у плодов при прогрессирующей беременности (подробнее см. главы 5 и 8). В подавляющем большинстве они являются спорадическими, и вероятность их повторного возникновения крайне мала [188]. Поэтому результаты кариотипирования плода при замершей или неразвивающейся беременности помогают установить причину остановки развития плода, однако часто оказываются малоинформативными для прогноза.

Таким образом, минимальный объем информации для оценки повторного риска должен включать данные о возрасте и кариотипе родителей, цитогенетической форме хромосомной болезни у ребенка (или плода), риске возникновения других геномных мутаций, сведения о кариотипе сибсов (если таковые имеются). При определении численности группы высокого риска по фактору наличия в анамнезе ребенка/плода с хромосомной болезнью необходимо учитывать ежегодные данные регистра хромосомной патологии и демографическую ситуацию в конкретном регионе. Существенное значение имеет детородный потенциал, который определяется возрастом женщины, уровнем

экономической помощи семьям, имеющим детей-инвалидов, а также возможностями медико-социальной реабилитации ребенка с хромосомной болезнью.

9.4.3.3. Наличие ребенка (плода) с МВПР в анамнезе

МВПР могут быть следствием хромосомных и генных мутаций, а также результатом воздействия различных тератогенов, либо сочетанным влиянием этих факторов (подробнее см. главу 8). Ведущая роль при определении этиологии пороков отводится цитогенетическим исследованиям, что обусловлено высокой частотой хромосомных синдромов в структуре МВПР (до 51 %) [181]. По сути, кариотипирование в настоящее время рассматривается как способ дифференциальной диагностики хромосомных и нехромосомных ВПР, хотя среди всех врожденных пороков на долю связанных с хромосомным дисбалансом приходится около 6 % [534].

Прогноз повторного рождения ребенка с МВПР зависит исключительно от того, насколько точно установлена причина МВПР у предыдущего ребенка или плода у родителей с нормальным кариотипом. Так, в случае хромосомных синдромов средний риск повторения составляет не более 1 %, а в случаях нехромосомных — на порядок выше (9–10 %), причем для рецессивно-наследуемых моногенных форм он составляет около 5 % [97]. Следует отметить также, что большинство врожденных пороков развития, в том числе и МВПР, являются следствием новых мутаций. Так, с мутациями *de novo* связано более 90 % случаев хромосомных синдромов и свыше 80 % синдромов с аутосомно-доминантным типом наследования [32]. При этом фенотипическая гетерогенность характерна для всех МВПР, независимо от их этиологии. Однако зачастую МВПР оказываются несовместимыми с жизнью, и заключение о природе комплекса пороков основывается на результатах патоморфологических или УЗ-исследований.

Между тем, без цитогенетического подтверждения хромосомного дисбаланса у ребенка (или плода) вопрос об этиологии МВПР остается открытым. Так, по данным Диагностического центра (Медико-генетического) в Санкт-Петербурге за 2000–2003 годы клинический диагноз синдрома Дауна у детей подтверждается при кариотипировании в 84 % случаев, а хромосомный дисбаланс при МВПР — только в 14 % [197].

Таким образом, причиной большинства МВПР оказываются нехромосомные синдромы, а при прогнозе в отношении хромосомной пато-

логии у плода при следующей беременности в таком случае следует исходить из популяционных частот. Тем не менее, результаты пренатального кариотипирования свидетельствуют о том, что риск хромосомных аномалий у плода в группе беременных, имеющих в анамнезе ребенка или плода с МВПР неясной этиологии, оказывается выше ожидаемого. Так, в группе беременных, имеющих в анамнезе ребенка или плода с МВПР, нами было выполнено 182 пренатальные диагностики. В 4 случаях были выявлены плоды с хромосомной патологией (2,2%), что сопоставимо с частотой в группе с повторными хромосомными аномалиями у потомства (2,6%) и существенно превышает таковую при низком риске рождения ребенка с хромосомной болезнью (0,6%). При этом в структуре показаний к пренатальному кариотипированию численность группы беременных с репродуктивным анамнезом, осложненным рождением ребенка или прерыванием беременности плодом с МВПР, составила в наших исследованиях всего 2,3% (181 из 8000).

Следует особо подчеркнуть, что при наличии в семье ребенка с МВПР неясной этиологии нормальный кариотип у плода при следующей беременности не является гарантией рождения здорового ребенка. В некоторых случаях МВПР могут быть обусловлены микрохромосомными перестройками, для диагностики которых стандартные методы кариотипирования не пригодны. Поэтому при подозрении на моногенные или микрохромосомные синдромы необходимо провести своевременное обследование больного ребенка и родителей, а при планировании инвазивного вмешательства — предусмотреть получение плодного материала для диагностики молекулярными методами. Следует помнить также, что генетическую природу многих МВПР установить не удастся. Поэтому после исключения наследственной патологии всеми доступными методами, адекватными для каждого конкретного случая, целесообразно рекомендовать УЗИ в динамике, приурочивая его проведение к максимально информативным срокам, позволяющим исключить пороки, установленные у предыдущего сибса.

Таким образом, при расчете риска по рождению ребенка с хромосомной болезнью у беременных, имеющих в анамнезе ребенка или плода с МВПР неясной этиологии, следует исходить из частоты, эмпирически установленной при пренатальном кариотипировании. После исключения хромосомной патологии у плода целесообразно ведение беременности с УЗ-контролем в динамике.

9.4.3.4. Аномалии кариотипа у родителей

Гетерозиготное носительство хромосомных aberrаций является одним из наиболее оправданных показаний для инвазивной пренатальной диагностики. В структуре обращаемости на пренатальную диагностику, однако, эта категория пациентов весьма немногочисленна и составляет от 0,5 до 5% [67, 816]. Следует напомнить, что многие мужчины-носители реципрокных транслокаций имеют нарушения сперматогенеза вплоть до полной стерильности. Именно этим объясняется тот факт, что в супружеских парах, направляемых на пренатальную диагностику, мужчины-носители структурных перестроек встречаются в 1,3–3,3 раза реже, чем женщины [347]. По нашим данным на 2004 год, удельный вес этой группы составил 3% (225 из 7500), при этом в 55 случаях носителями были мужчины и в 93 — женщины. В 77 случаях (в основном 9qh) родительское происхождение выявленной в процессе пренатального кариотипирования хромосомной перестройки не установлено.

Влияние различных аномалий кариотипа и полиморфных вариантов хромосом на частоту образования несбалансированных гамет рассмотрено нами в главе 6. Напомним, что вероятность образования нормальной, сбалансированной и генетически неполноценной зиготы зависит от многих причин, в том числе от типа хромосомной перестройки, от вовлеченных в перестройку хромосом, от локализации точек разрыва, а также от родительского происхождения хромосомной aberrации. С учетом этих факторов, а также типа сегрегации aberrантных хромосом в мейозе, разработаны схемы и таблицы, согласно которым можно рассчитать риск рождения ребенка с aberrантным кариотипом [125, 347, 578]. В любом случае, частота потомков-носителей несбалансированных кариотипов оказывается ниже теоретически ожидаемой. Поэтому значения повторного риска имеют эмпирический характер, так как коэффициенты отбора против несбалансированных гамет и зигот разного типа неизвестны [42]. Эмпирический риск для потомства можно рассчитать и в случаях носительства численных аномалий кариотипа, которые обусловлены, в основном, маркерными хромосомами или дисбалансом в системе половых хромосом. При расчетах риска необходимо учитывать вероятность однородительской дисомии у плода по сегментам хромосом, вовлеченным в перестройку.

Согласно обобщенным мировым сводкам, эмпирический риск рождения больного ребенка в семьях, где один из супругов является

носителем транслокации, варьирует в зависимости от типа перестройки и пола носителя (5,4–11,6 %), а также от сроков беременности (13,3 % в I триместре и 8,5 % — во II) [266, 749]. Средняя частота несбалансированных кариотипов, выявленных в процессе пренатального кариотипирования в группе супружеских пар, где один из партнеров являлся носителем аномального кариотипа, в нашем исследовании составила 10,22 %.

Следует отметить, что участие врачей-клиницистов сложилось мнение о нецелесообразности пренатальной диагностики при носительстве некоторых хромосомных перестроек, т. к. хромосомный дисбаланс в зиготе заведомо будет несовместим с ее развитием, и беременность либо не будет зарегистрирована, либо закончится спонтанным выкидышем в ранние сроки, а прогрессирующая беременность будет свидетельствовать о сбалансированном или нормальном кариотипе у плода. На наш взгляд, такой экспериментальный подход неприемлем. Современное состояние методов пренатальной диагностики, в том числе доимплантационной, позволяет провести анализ хромосомного набора практически на любой стадии и выработать оптимальную тактику планирования и ведения беременности.

Таким образом, в зависимости от возраста, наличия хромосомных перестроек, наличия ребенка с МВПР или хромосомными болезнями беременная женщина автоматически попадает в группу высокого риска хромосомной патологии у плода и незамедлительно подлежит направлению на ПД. Следует подчеркнуть, что результаты биохимического и ультразвукового скрининга позволяют снизить число инвазивных вмешательств в этих группах риска. При этом важно помнить, что наличие ультразвуковых и/или биохимических маркеров в группах цитогенетического скрининга может только увеличивать уже имеющийся риск рождения ребенка с хромосомной патологией. В частности, в основу расчета риска болезни Дауна у плода при биохимическом скрининге положены таблицы возрастного риска, а высокая эффективность выявления УЗМ хромосомных болезней плода у возрастных беременных показана во всех исследованиях. В то же время, отсутствие дополнительных ультразвуковых и биохимических маркеров отнюдь не гарантирует наличие нормального кариотипа у плода и, таким образом, не снимает необходимость пренатального кариотипирования в группах, сформированных при цитогенетическом скрининге.

9.4.4. Молекулярный скрининг

Молекулярный скрининг представляет собой часть обширной программы скрининга наследственной патологии, которая встречается у 1% всех новорожденных. Скринирующие программы ДНК-диагностики используются для выявления досимптоматических больных и бессимптомных гетерозиготных носителей наиболее частых моногенных болезней. Выявление гетерозиготного носительства с точной идентификацией мутации в случае аутосомно-рецессивных заболеваний или заболеваний, сцепленных с X-хромосомой, принципиально важно для определения информативности семьи, то есть возможности проведения ПД.

Реально такие программы применимы только к тем моногенным болезням, для которых можно идентифицировать не менее 90% мутаций. В России пока доступны идентификации только около 65–70% случаев мутаций гена муковисцидоза, что явно недостаточно для внедрения скринирующих программ ДНК-диагностики. Однако уточнение диагноза у больного ребенка и последующее обследование членов семьи представляет собой вариант селективного скрининга в группах высокого риска.

ДНК-скрининг наиболее частых (мажорных) мутаций самых распространенных моногенных болезней (муковисцидоз, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшенна, гемофилия А и В, спинальная мышечная амиотрофия Верднига–Гоффмана, адреногенитальный синдром и др.) может проводиться не только в семьях высокого риска, но и по желанию супругов при составлении «Генетической карты репродуктивного здоровья» (см. главу 11).

9.4.5. Иммунологический скрининг

Иммунологический скрининг включает тестирование Rh-принадлежности матери и ряда инфекций, потенциально нарушающих внутриутробное развитие плода.

Rh-конфликтная беременность — одна из серьезных проблем современного акушерства. Возникающая вследствие такого конфликта гемолитическая болезнь — грозное осложнение беременности, которое можно предотвратить при соблюдении двух следующих условий: своевременное определение Rh-принадлежности беременной (супругов) и при отрицательной резус-принадлежности крови беременной — определение наличия антирезусных антител в ее крови. При необходимости инвазивной пренатальной диагностики хромосомной патологии плода у резус-отрица-

тельной женщины вопрос о выборе оптимального срока беременности для проведения манипуляции решается индивидуально с учетом ее акушерского анамнеза, степени выраженности гемолитической болезни плода при предыдущей беременности и наличия титра антител к Rh-фактору. Разработан и алгоритм обследования и проведения инвазивной ПД наследственных болезней у беременных с Rh-отрицательной принадлежностью [151, 197].

Опасность для плода представляют и ряд инфекций. К таковым относятся: вирус краснухи, простого герпеса, цитомегаловирус, вирус ветряной оспы, возбудители токсоплазмоза. Присутствие IgG-антител при отсутствии IgM-антител указывает на то, что женщина переболела данным заболеванием до беременности. Высокие титры IgG-антител при наличии IgM-антител указывают на текущую инфекцию. Применение современных молекулярных тест-систем для детекции возбудителей перечисленных инфекций методом ПЦР в сочетании с классическими серологическими и бактериологическими методами позволяет достаточно надежно проводить иммунологический скрининг не только на ранних сроках беременности, но и в преконцепционном периоде.

9.5. Показания для направления на инвазивную пренатальную диагностику

В соответствии с принципами формирования групп риска, основные показания к инвазивной пренатальной диагностике с целью кариотипирования плода можно подразделить на две категории. Первая категория включает группы, формируемые по результатам обследования плода неинвазивными методами пренатальной диагностики (ультразвуковые и биохимические маркеры хромосомных болезней). Вторая категория формируется при цитогенетическом скрининге и включает группы, в которых хромосомные aberrации либо наследуются, либо возникают с повышенной частотой *de novo*.

Группы риска для инвазивной ПД формируются по результатам скринирующих программ (см. раздел 9.4), а также на основании медико-генетического консультирования (см. раздел 9.3).

Стандартные показания для направления на консультацию для определения целесообразности проведения инвазивной ПД, одобренные ВОЗ, включают:

- возраст женщины старше 35 лет;
- наличие не менее двух самопроизвольных абортов на ранних сроках беременности;
- наличие в семье ребенка или выявление при предыдущей беременности плода с болезнью Дауна и другими хромосомными болезнями;
- наличие в анамнезе ребенка с множественными врожденными пороками;
- семейное носительство хромосомных перестроек;
- моногенные заболевания, ранее диагностированные в семье или у ближайших родственников;
- облучение кого-нибудь из супругов или применение до зачатия ряда фармакологических препаратов (цитостатиков, антиэпилептических лекарств, некоторых антибиотиков, противоопухолевых препаратов и др.);
- высокий риск рождения ребенка с хромосомной болезнью по результатам биохимического скрининга;
- пороки или отклонения развития, выявленные при ультразвуковом исследовании.

Важно отметить, что спектр показаний и объем инвазивной ПД для каждого центра ПД определяется его диагностическими возможностями и штатным расписанием.

Анализ обобщенных собственных результатов инвазивной ПД за 18 лет (всего более 8000 случаев) позволил отказаться ввиду низкой эффективности от таких показаний для кариотипирования плода как привычное невынашивание, применение при беременности цитостатических препаратов и облучение.

Стандартными показаниями для направления на инвазивную ПД в Санкт-Петербурге являются:

- возраст женщины 35 лет и старше;
- наличие в семье ребенка или выявление при предыдущей беременности плода с болезнью Дауна, с другими хромосомными болезнями, с множественными врожденными пороками развития;
- семейное носительство хромосомных перестроек или генных мутаций;
- наличие в семье моногенных заболеваний: муковисцидоза, фенилкетонурии, миопатии Дюшенна, миотонической дистрофии, хореи Гентингтона, болезни Вильсона–Коновалова,

Виллебранда, Кеннеди, адреногенитального синдрома, спинальной амиотрофии Верднига–Гоффмана, атаксии Фридриха, телеангиэктазии Луи–Барр, агаммаглобулинемии швейцарского типа, миопатии Шарко–Мари–Тус и других;

- ультразвуковые маркеры хромосомных болезней у плода;
- высокий риск болезни Дауна по результатам биохимического скрининга маркерных сывороточных белков во II триместре беременности.

Согласно мировым данным, высокий удельный вес (до 90%)

Таблица 9.6. Результаты пренатальной диагностики в разных группах риска* (по данным Санкт-Петербургского ФМГЦ за май 1987 — март 2005 гг.)

№	Показание к инвазивной ПД	Вид скрининговой программы	Всего диагнос-тик	Хромосомная патология у плода**	
				Число	%
1	Возраст 35 лет и старше	Цитогенетический	3516	141	4,0
2	Наличие ребенка или плода с хромосомной болезнью	Цитогенетический	505	13	2,6
3	Наличие ребенка или плода с МВПР	Цитогенетический	182	4	2,2
4	Аномалии кариотипа у родителей	Цитогенетический	153	14	9,1
5	УЗМ хромосомных болезней, включая изолированные и множественные пороки развития	Ультразвуковой	862	152	17,6
6	Биохимические маркеры хромосомных болезней (риск $\geq 0,5$)	Биохимический	981	17	1,7
7	Моногенные болезни; Rh-конфликт; обеспокоенность состоянием плода; планирование семьи	Вне скрининга	1801	11	0,6
ВСЕГО			8000	352	4,4

* Группы риска сформированы по принципу выбора ведущего показания. В возрастной группе не учтено наличие ультразвуковых и биохимических маркеров хромосомных болезней; в группе с ультразвуковыми маркерами не учтены биохимические маркеры (возраст беременной < 35 лет); в группу с биохимическими маркерами включены только беременные моложе 35 лет с риском болезни Дауна > 0,5%. В группу №7 включены беременные без сопутствующих показаний.

** Указаны только геномные и несбалансированные хромосомные мутации.

в структуре обращаемости на пренатальную диагностику принадлежит группам цитогенетического скрининга. В нашем центре с мая 1987 по март 2005 года было проанализировано в общей сложности 8000 пренатальных кариотипов (табл. 9.6). Из них 4356 (54 %) относились к группе цитогенетического, 981 (12 %) — биохимического и 808 (11 %) — ультразвукового скрининга. В 1801 (23 %) случае кариотипирование было проведено в группах низкого риска хромосомных болезней у плода — сопутствовало диагностике моногенных болезней, предвещало лечение гемолитической болезни плода при Rh-конфликтной беременности или было проведено по желанию родителей, обеспокоенных состоянием или полом плода. Частота хромосомных болезней в этих группах составила 3,9, 1,7, 17,6 и 0,6 % соответственно. Результаты пренатального кариотипирования, полученные нами, соответствуют данным аналогичных центров.

9.6. Инвазивные методы получения плодного материала

Инвазивными (оперативными) методами ПД называются внутриматочные вмешательства под ультразвуковым контролем, выполняемые с целью получения плодного материала для последующих гистологических, биохимических, цитогенетических или молекулярных анализов.

Зародыш человека доступен для исследований, а следовательно, и для диагностики, практически на любой стадии развития (рис. 9.4). Основными инвазивными методами являются методы микроургии, позволяющие удалять полярные тельца или отдельные blastomeres у доимплантационных зародышей; после имплантации — это трансабдоминальная (или трансвагинальная) хорионбиопсия, реже — ранний амниоцентез; во II триместре беременности — плацентобиопсия, амниоцентез и кордоцентез (пункция пуповины с целью забора крови плода). В III триместре обычно используют кордоцентез.

Выбор инвазивного метода определяется сроком беременности, показаниями к его проведению, инструментальной и методической оснащённостью центра ПД, а также квалификацией акушера-оператора. Последнее обстоятельство особенно существенно отражается на ранних послеоперационных осложнениях, под которыми понимают угрожающие состояния, вплоть до самопроизвольного прерывания беременности в течение 7–14 дней после операции.


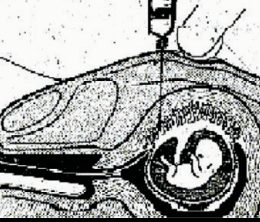
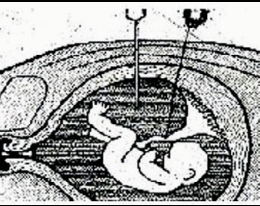
	<p align="center">Доимплантационный период (стадия дробления)</p> <p>Методы ЭКО:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Преконцепционная диагностика (полярные тельца) ➤ Доимплантационная диагностика (бластомеры или трофобласт)
	<p align="center">I триместр беременности (период органогенеза)</p> <p>Хорионбиопсия:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Трансцервикальный способ (7–12-я недели) ➤ Трансабдоминальный способ (с 9/10-й недели)
	<p align="center">II триместр беременности (плодный период)</p> <p>Плацентобиопсия:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Цитогенетическая диагностика — до 22-й недели ➤ Молекулярная диагностика — до 26-й недели <p>Амниоцентез (с 13/14-й недели)</p> <p>Кордоцентез (с 19/20-й недели)</p>

Рис. 9.4. Инвазивные методы пренатальной диагностики

В нашем центре широко применяются трансабдоминальная аспирация ворсин хориона/плаценты, амниоцентез и кордоцентез. Риск прерывания беременности и внутриутробной гибели плода в течение двух недель после этих операций, согласно нашим данным за 2000–2005 годы, составляет 0,22 %.

Специальные лабораторные методы исследования плодного материала (бластомеров, ворсинок хориона, амниоцитов или лимфоцитов плода) могут быть различны, зависят от целей и сроков ПД (табл. 9.2). Наиболее универсальными являются методы молекулярной (ДНК) диагностики и методы цитогенетического анализа.

9.7. Принципы и методы диагностики хромосомных болезней

В настоящее время проблема цитогенетической ПД на любом сроке беременности практически решена. Разработаны надежные и

Таблица 9.7. Характеристика методов получения препаратов хромосом для стандартного кариотипирования плода

Метод	Преимущества	Недостатки	Результативность
Культивирование клеток амниотической жидкости и клеток хориона или плаценты	Высокое качество хромосомных препаратов: — достаточное количество метафазных пластинок — возможность дифференциального окрашивания хромосом различными методами	Контаминация культур материнскими клетками Длительность культивирования (1,5–3 недели) Опасность инфицирования культуры Дорогостоящие реактивы, оборудование и расходные материалы Вес образца хориона не менее 15 мг	99 % (~ 70 %)*
Варианты «прямого» метода анализа клеток хориона или плаценты	Скорость (1–2 дня) Возможность анализа образца небольшого объема Возможность анализа с 9,5 до 20 недель беременности Отсутствие контаминации материнскими клетками Экономичность	Низкий митотический индекс Недоступность некоторых методов дифференциальной окраски хромосом	96–99 % (99,8 % — I триместр; 99,6 % — II триместр)*
Культивирование лимфоцитов пуповинной крови	Относительная скорость (2–4 дня) Высокое качество хромосомных препаратов: — достаточное количество метафазных пластинок — возможность дифференциального окрашивания хромосом различными методами	Контаминация культур материнскими клетками Исследования начинающая с 18-й недели беременности	> 99 % (99,9 %)*

* По собственным данным.

эффективные методы хромосомного анализа клеток плода и зародышевых оболочек. В зависимости от срока беременности и задач исследования материалом для хромосомного анализа могут служить клетки амниотической жидкости, хориона, плаценты и лимфоциты пуповинной крови плода, полученные тем или иным инвазивным способом (см. раздел 9.6). Все эти клетки, как установлено, имеют плодное происхождение и по своим генотипическим характеристикам соответствуют клеткам самого плода. В нашем центре наиболее часто используются клетки хориона (I триместр) или клетки плаценты (II триместр), полученные с помощью трансабдоминальной хорионбиопсии или плацентобиопсии. Хромосомные препараты из тканей хориона или плаценты готовят прямым методом, детально рассмотренным нами ранее в методических рекомендациях [16] и в соответствующем руководстве [192] (см. также Приложение).

Преимущества и недостатки цитогенетического анализа при использовании разных методов получения хромосомных препаратов из образцов плодного материала суммированы в таблице 9.7. Использование в большинстве центров комплекса цитогенетических и молекулярно-цитогенетических методов диагностики позволяет получить наиболее полную информацию о кариотипе плода на различных стадиях внутриутробного развития.

9.7.1. Особенности цитогенетического анализа клеток различного плодного происхождения

Основные принципы получения и анализа препаратов подробно описаны в главе 4. Здесь лишь кратко напомним особенности использования образцов материала для пренатального кариотипирования.

9.7.1.1. Клетки амниотической жидкости

Клетки амниотической жидкости (**КАЖ**) представлены несколькими типами различного происхождения:

- клетки амниотической оболочки (собственно амниоциты);
- эпителиальные клетки плода (эпидермиса, пищеварительного тракта, мочеполовых и дыхательных путей, слизистой ротовой полости).

Количественный и качественный состав КАЖ, а также концентрация жизнеспособных клеток имеют индивидуальную варибель-

ность и зависят от стадии развития. Оптимальными для ПД являются амниоциты, которые обычно активно пролиферируют и являются специфическими для данной культуры. Наиболее часто для культивирования используют амниотические клетки, полученные в срок 15–18 недель беременности. Использование для этих целей амниоцитов более ранних (12–14 недель беременности) или более поздних (после 20-й недели беременности) сроков принципиально возможно, но, как правило, резко осложняет и удлинняет процесс диагностики.

Стандартное культивирование амниоцитов с момента получения образца АЖ до кариотипирования занимает 14–21 день. К недостаткам можно отнести высокую стоимость культуральных питательных сред и оборудования, что немаловажно для отечественных лабораторий, а также высокую (до 2%) вероятность контаминации образца клетками материнского происхождения.

9.7.1.2. Клетки ворсин хориона (плаценты)

Клетки ворсинчатого хориона (плаценты), доступные для ПД, имеют различное происхождение:

- клетки цитотрофобласта (дифференцируются на стадии морулы);
- клетки мезенхимы (дифференцируются на стадии бластоцисты).

Для хромосомного анализа по клеткам хориона или плаценты используют два основных метода.

1. *Длительное культивирование*: растущие в монослое первичные культуры имеют гетерогенный клеточный состав с преимущественным ростом фибробластоподобных клеток мезенхимальной стромы ворсин. Образование колоний или рыхлого монослоя происходит обычно к 10–12 дню культивирования. Основными недостатками метода являются длительность культивирования и контаминация культур материнскими клетками.

2. *«Прямые» препараты*. Метод анализа «прямых» препаратов базируется на исследовании спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта без их предварительного культивирования в сроки от 10 до 20 недель беременности.

Нами разработаны собственные модификации прямого метода — метод «стряхивания — отпечатывания» и ускоренный прямой метод, которые позволяют получать препараты из хориона/плаценты, удовлетворяющие всем критериям кариотипирования. В сочетании с флуо-

ресцентными методами дифференциальной окраски хромосом результативность этих методов превышает 99 %.

Следует подчеркнуть, что эти модификации пригодны для приготовления препаратов хромосом из тканей с высокой естественной митотической активностью, включая любые ткани и органы зародыша. Интерфазные ядра, обработанные таким способом, вполне пригодны для метода FISH со специфическими ДНК-зондами, что важно при верификации цитогенетического пренатального диагноза.

9.7.1.3. Лимфоциты пуповинной крови плода

Для хромосомного анализа крови плода используют стандартную методику стимулирования лимфоцитов фитогемагглютинином (ФГА).

Этот метод дает наиболее адекватное представление о хромосомном статусе плода и настоятельно рекомендуется для кариотипирования плода в случае хромосомного мозаицизма в плаценте, а также при наличии пороков развития не только во II, но как показывает наш опыт и в III триместре беременности. В последнем случае кариотипирование плода позволяет разрешить вопрос о тактике ведения беременности, родов и неонатального периода.

9.7.2. Основные принципы цитогенетического анализа в пренатальной диагностике

При пренатальном кариотипировании следует руководствоваться рекомендациями, принятыми в отечественной и международной клинической цитогенетике [92, 408, 547], а также нормативными документами МЗ РФ (Приказ МЗ РФ № 316 от 30.12.1993). Заключение о кариотипе должно соответствовать правилам Международной номенклатуры хромосом [510].

Программы контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы включают состав и квалификацию персонала, оборудование и реактивы, а также ряд параметров, касающихся непосредственного выполнения хромосомного анализа [123].

В связи с увеличением числа центров ПД, а также отсутствием единой системы контроля качества, представляется целесообразным рассмотреть основные требования к организации работы цитогенетических

подразделений, обратив особое внимание на критерии качества пренатального кариотипирования.

9.7.2.1. Состав и квалификация персонала

Согласно нормативам (Приказ МЗ РФ № 316 от 30.12.1993), цитогенетическая пренатальная диагностика осуществляется коллективом, состоящим из специалистов с высшим и средним специальным образованием. При этом штатная структура цитогенетического подразделения должна иметь не менее двух ставок врачей-цитогенетиков и соответствующее им число ставок фельдшеров-лаборантов. При этом каждый врач-цитогенетик должен выполнить 160 пренатальных кариотипов в год.

9.7.2.2. Оборудование

Необходимым условием точности проводимых исследований является соответствующее им лабораторное оборудование, контроль и сертификация которого осуществляются по определенной схеме.

9.7.2.3. Реактивы

Следует особо подчеркнуть, что необходимо *заблаговременно* проверять качество всех реактивов, используемых для приготовления рабочих растворов. Во избежание повторных технических ошибок рекомендуется учитывать и анализировать их характер и частоту в режиме лабораторной базы ошибок.

9.7.2.4. Показатели качества цитогенетических исследований

Число анализируемых метафаз. Для препаратов из культур клеток достаточным считается наличие 20–50 метафазных пластинок на предметное стекло. Качество «прямых» препаратов из цитотрофобласта хориона или плаценты, как отмечалось выше, можно считать удовлетворительным, если на стекле присутствует более 10 метафаз, пригодных для подсчета и анализа структуры хромосом. При этом независимо от способа приготовления препаратов разброс хромосом признается хорошим, если наложения хромосом отсутствуют или представлены небольшим числом (1–2) в более 80 % пластинок, и плохим, если многочисленные наложения хромосом встречаются более чем в 20 % метафаз.

Качество окраски. Для ориентировочной оценки уровня разрешения рекомендуется произвести подсчет числа G-сегментов в хромосомах 1 и 2 с умножением полученной суммы на 6. Качество окраски признается хорошим, если ее четкость при уровне разрешения ~ 550 сегментов позволяет идентифицировать четыре G⁺-сегмента на 18q и 3 — на 11p, 7q33 и 7q35, особенно если удастся визуализировать сегмент 22q13.2. Такой уровень (400–550 сегментов на гаплоидный набор) достаточен для стандартного кариотипирования. Для анализа микроперестроек хромосом требуется более высокое разрешение (> 800 сегментов), которое достигается при использовании репликационных вариантов дифференциального окрашивания.

Время анализа. Промежуток времени от момента получения плодного материала до постановки цитогенетического диагноза зависит от методических особенностей выполняемого исследования, пропускной способности лаборатории, диагностической сложности конкретного случая, необходимости уточняющих лабораторных мероприятий и т. д. Оптимальным для кариотипирования по клеткам ворсин хориона является срок 3–7 дней, клеток амниотической жидкости — 10–16 дней, лимфоцитов пуповинной крови — 4–7 дней. Большую часть времени составляет этап культивирования, тогда как собственно анализ хромосомных препаратов в стандартном режиме занимает 1–1,5 рабочих дня. Однако реальные сроки цитогенетической диагностики могут варьировать в широком диапазоне. Так, высокотехнологичный и продуктивный метод FISH позволяет проводить анализ по интерфазным ядрам на препаратах некультивированных клеток за 1–2 дня. Этот метод широко используется за рубежом для экспресс-диагностики наиболее распространенных анеуплоидий. Разработанный нами ускоренный прямой метод приготовления препаратов из цитотрофобласта в сочетании с окрашиванием хромосом флуорохромом Hoechst 33258 позволяет провести традиционное кариотипирование и при необходимости выдать цитогенетическое заключение в день получения материала.

Увеличение времени анализа, оптимального для каждого метода, обусловлено либо техническими, либо диагностическими проблемами. К техническим проблемам можно отнести низкий митотический индекс и неудовлетворительное качество метафазных пластинок, что требует просмотра всех полученных препаратов. Возможные неудачи

при цитогенетическом исследовании обусловлены, как правило, отсутствием метафазных пластинок, пригодных для анализа. Средние стандарты технических (неполучение результата при наличии жизнеспособных клеток) и культуральных (отсутствие адекватного роста клеток) неудач при кариотипировании по клеткам амниотической жидкости и хориона составляют 1,5 и 2 % соответственно, а по лимфоцитам периферической крови — 5 % [123]. Накопленный нами опыт (более 8000 пренатальных диагностик) показывает, что результативность анализа по клеткам цитотрофобласта на «прямых» препаратах из хориона и плаценты, а также по ФГА-стимулированным лимфоцитам пуповинной крови оказывается выше (в среднем 99,8 %) [88]. Причины невозможности проведения цитогенетического анализа в 0,2–0,4 % случаев были рассмотрены нами в соответствующих разделах (глава 4). Вместе с тем, отсутствие или недостаточное число метафаз на «прямых» препаратах далеко не всегда связано с нехваткой материала, полученного при хорион- или плацентобиопсии. Однако вес образца должен составлять ≥ 10 мг для ускоренного метода и ≥ 15 мг для кратковременных культур, а в случае совмещения прямых методов с культивированием клеток в монослое — ≥ 30 мг.

Диагностическим проблемам и способам их решения посвящен специальный раздел этой главы. Отметим только, что сложные случаи требуют не только применения дополнительных методик для уточнения первичного цитогенетического заключения, но и кариотипирования родителей, что задерживает постановку цитогенетического диагноза как минимум на неделю.

Правила кариотипирования. Заключение о кариотипе должно базироваться на идентификации и анализе структуры всех хромосом на 2–3 метафазных пластинках. Для заключения о кариотипе минимальное число пластинок должно составлять 11–15. Такой объем исследования позволяет исключить хромосомный мозаицизм с вероятностью более 95 %. Мозаичная форма геномных мутаций устанавливается при наличии не менее двух клеток с однотипным изменением кариотипа, что требует увеличения размера анализируемой выборки (подробнее о статистических проблемах диагностики мозаицизма см. [187]).

Особенности получения информации о кариотипе плода при использовании различных методик, обусловленных спецификой исследуемого материала, описаны в главе 4.

Следует отметить, что системы анализа изображений с программным обеспечением для кариотипирования целесообразно использовать в интерактивном режиме. Ни одна из существующих в настоящее время программ для автоматического кариотипирования не является совершенной, и любая предложенная в автоматическом режиме кариограмма нуждается в проверке. Разница между программами состоит только в числе ошибок в кариограмме, полученной при автоматической раскладке идеальных метафазных пластинок с хорошим разбросом и отличной G-окраской хромосом. Как правило, требуется коррекция 2–5 и более ошибок, вызванных неправильным распознаванием гомологичных и негомологичных хромосом и неадекватным размещением их в ячейках раскладки. Следует напомнить, что под *кариотипом* понимают *совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора единичной соматической клетки* [134, 510]. Поэтому в кариограмме, которая является систематизированной характеристикой кариотипа, должны быть представлены гомологичные хромосомы, идентифицированные на одной метафазной пластинке. Недопустимо использовать при составлении кариограммы хромосомы, принадлежащие разным наборам, т. е. из разных клеток.

Формулировка цитогенетического диагноза. Цитогенетический диагноз должен быть сформулирован в точном соответствии с рекомендациями Международной системы цитогенетической номенклатуры хромосом [510]. С основными правилами Международной цитогенетической номенклатуры, переведенными на русский язык, можно ознакомиться в изданиях отечественных авторов [38, 124]. В любых случаях нестандартного кариотипа цитогенетическую формулу целесообразно сопровождать развернутым заключением, в котором интерпретируется цитогенетический диагноз, а также поясняются указанные в формуле особенности хромосомного набора.

В заключение следует отметить, что при стандартном кариотипировании исключается носительство всех геномных мутаций (анеуплоидий и полиплоидий) и Робертсоновских транслокаций, а также многих реципрокных транслокаций и некоторых инверсий, особенно если они изменяют морфологию хромосом, вовлеченных в перестройку. Возможность точной идентификации хромосомных aberrаций зависит от разрешающей способности использованного метода дифференциальной окраски и в целом ряде случаев представляет значительные

трудности. Принимая также во внимание статистические проблемы диагностики хромосомного мозаицизма даже в пределах одной ткани, важно подчеркнуть, что стандартное пренатальное кариотипирование позволяет исключить хромосомные болезни с вероятностью $> 99\%$, что, к сожалению, недостаточно для абсолютной гарантии рождения здорового ребенка.

9.7.3. Диагностические проблемы кариотипирования плода

Трудности при ПД могут представлять как геномные, так и хромосомные мутации, некорректная интерпретация которых может привести к диагностическим ошибкам. Сложными для цитогенетического анализа и требующими уточнения являются многие наследуемые аберрации хромосом, все случаи структурных перестроек, возникшие *de novo*, неидентифицированные сверхчисленные маркерные хромосомы, мозаицизм хромосом и однородительская дисомия (ОРД).

Учитывая различную диагностическую и прогностическую значимость выявленных изменений кариотипа, а также разрешающую способность уточняющих диагностических мероприятий, рассмотрим кратко каждую из этих проблем, а также оптимальные варианты их решения.

9.7.3.1. Структурные перестройки хромосом, возникшие *de novo*

Если показанием для кариотипирования плода является носительство структурной перестройки одним из родителей, то при выборе способа инвазивного вмешательства необходимо учитывать особенности хромосомной аберрации. К сожалению, разрешающая способность цитогенетического анализа на «прямых» препаратах хориона по сравнению с препаратами из культивированных клеток плода (лимфоцитов или амниоцитов) невысока. Поэтому точная диагностика в I триместре беременности ограничена Робертсоновскими транслокациями, а также другими перестройками, существенно меняющими морфологию хромосом. При реципрокных транслокациях, в образовании которых принимают участие равноценные по размеру и сходные по рисунку дифференциальной исчерченности участки хромосом, предпочтительнее проводить диагностику по лимфоцитам пуповинной крови. Аналогичных рекомендаций следует придерживаться и в случаях парацен-

трических и перицентрических инверсий. Наибольшие трудности при анализе хромосом даже из культивированных клеток представляют небольшие по размеру перестройки, особенно если они локализованы в теломерных G-отрицательных сегментах хромосом. Следует подчеркнуть, что практически во всех случаях семейного носительства перестроек целесообразно проводить сравнительный анализ хромосом плода и родителей, используя комплекс методов дифференциального окрашивания и FISH с ДНК-зондами, необходимых для идентификации конкретной перестройки.

Спонтанные хромосомные aberrации, то есть перестройки, не унаследованные от кого-либо из родителей при подтвержденном отцовстве, пренатально встречаются относительно редко (0,06–0,20 % от всех исследований) [749]. В наших исследованиях их частота составила 0,07 % (у 5 из 7579 плодов).

При обнаружении хромосомной перестройки, действительно возникшей *de novo*, невозможно полностью исключить сопутствующие микроперестройки и, следовательно, несбалансированность хромосомного набора, и, тем более, определить наличие генных мутаций в точках разрывов. В этой ситуации, согласно рекомендациям Европейского общества перинатологов, риск рождения ребенка с какими-либо аномалиями развития оценивается в 10 % [749].

Принимая во внимание, что информация о развитии плода, полученная с помощью УЗИ, ограничена оценкой состояния отдельных органов и систем, желательнее во всех случаях неясного цитогенетического диагноза проводить кариотипирование биологических родителей. К таким случаям относятся также структурно полиморфные участки хромосом, которые необходимо дифференцировать от структурных аномалий:

- прицентромерные гетерохроматиновые районы хромосом 1, 16 и особенно 9 (варианты 9qh, 9ph, 9phqh);
- спутники на коротких плечах хромосомы 17 и на длинном плече Y-хромосомы;
- вариабельные размеры коротких (p) плеч акроцентрических хромосом групп D и G;
- длинное плечо Y-хромосомы, включая район Yqh.

Стандартная схема диагностики структурных перестроек, в том числе при отсутствии информации о кариотипе родителей на момент проведения

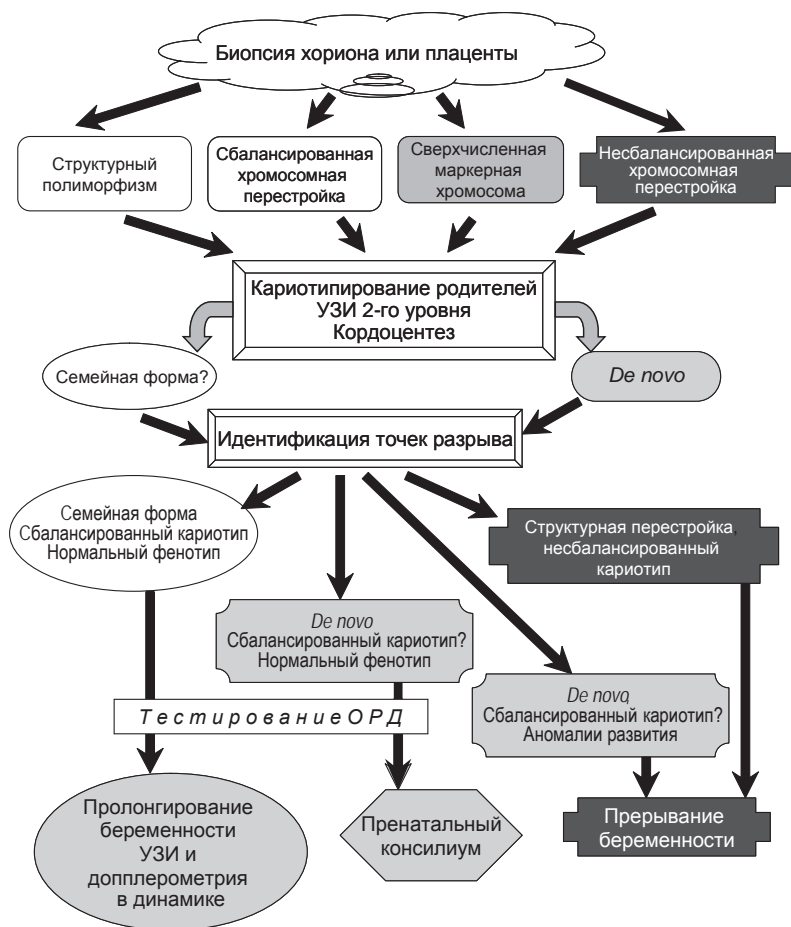


Рис. 9.5. Принципиальная схема пренатальной диагностики хромосомных мутаций

анализа, предполагает ряд диагностических мероприятий (рис. 9.5). При обнаружении структурной перестройки (или подозрении на ее наличие) необходимо уточнить ее происхождение, т. е. провести кариотипирование родителей. В любом случае необходимо определить сбалансированность аберрации, для чего предпринять попытки уточнения точек разрывов методом FISH с использованием локус-специфичных ДНК-зондов. При установлении родительской принадлежности сбалансированной хромосомной аберрации рекомендуется пролонгирование беременности с УЗ-контролем в динамике. Если установлен факт возникновения морфологически сбалансированной аберрации *de novo*, необходимо проинформировать беременную о высоком риске отклонений в развитии плода, а также о возможных психических и физических нарушениях у ребенка после рождения. Рекомендации по ведению беременности в этом случае целесообразно вырабатывать на пренатальном консилиуме с привлечением неонатологов и педиатров. В случае несбалансированного кариотипа, обусловленного перестройкой *de novo* или унаследованного от родителей вследствие сегрегации перестроенных хромосом, рекомендуется прерывание беременности. Следует подчеркнуть, что кариотипирование родителей при обнаружении любой хромосомной перестройки у плода является обязательным, т. к. имеет принципиальное значение не только для диагностики при настоящей беременности, но и для прогноза здоровья будущих детей. Зачастую носители структурных перестроек выявляются именно в таких ситуациях.

Носители хромосомных мутаций (реципрокных и Робертсоновских транслокаций, изохромосом, маркерных хромосом) относятся также к группе повышенного риска по ОРД у плода. Наличие хромосомных перестроек приводит к образованию гамет с частичной или полной анеуплоидией, при последующей коррекции которой возникает ОРД по хромосомам или сегментам хромосом, вовлеченных в перестройку. В этих группах, *a priori* имеющих риск ОРД у плода, целесообразно заранее предусмотреть получение пуповинной крови одновременно для цитогенетической и молекулярной диагностики во избежание повторных инвазивных манипуляций.

Особенного внимания заслуживают Робертсоновские транслокации с участием хромосом 14 и 15. Риск ОРД составляет 0,65%, если аберрантная хромосома образована негомологичными хромосомами,

и 66% — если она представлена транслокацией между гомологами или изохромосомой [868]. В случаях обнаружения при пренатальном кариотипировании таких структурных перестроек, наследуемых или возникших *de novo*, рекомендуется тестирование ОРД.

9.7.3.2. Маркерные хромосомы

Маркерными хромосомами обычно обозначают сверхчисленные хромосомы неизвестного происхождения. Некоторые из них являются результатом внутривнутрихромосомных, другие — межхромосомных перестроек. Условно маркерные хромосомы можно подразделить на несколько групп:

- по происхождению (возникшие *de novo* и наследуемые);
- по форме геномной мутации (мозаичные и немозаичные);
- по морфологии (спутничные, т. е. содержащие короткие плечи акроцентрических хромосом, и несателлитные).

Маркерные хромосомы в пренатальном периоде выявляются с частотой 0,6–0,96 : 1000 [482]. В зависимости от генетического материала, входящего в состав маркерной хромосомы, они могут сопровождаться пороками или задержкой развития плода, иметь серьезные клинические проявления сразу после рождения, затрагивать только репродуктивную или ментальную функции, либо фенотипически никак не проявляться. Определение природы маркерных хромосом всегда представляет значительные трудности, однако их идентификация при пренатальном кариотипировании, даже если они относятся к семейным формам, имеет принципиальное значение для тактики дальнейшего ведения беременности.

При обнаружении маркерной хромосомы у плода необходимо кариотипировать родителей для установления происхождения маркера (семейная форма или мутация *de novo*), провести идентификацию маркера всеми доступными методами и определить форму анеуплоидии (полная или мозаичная).

Прогноз более благоприятен, если один из фенотипически нормальных родителей (а также его родственники с нормальными репродуктивной функцией и интеллектом) является носителем идентичной маркерной хромосомы, представленной в той же форме (мозаичной или полной).

Стандартный алгоритм идентификации маркерной хромосомы включает различные методические приемы (рис. 9.6). На первом этапе

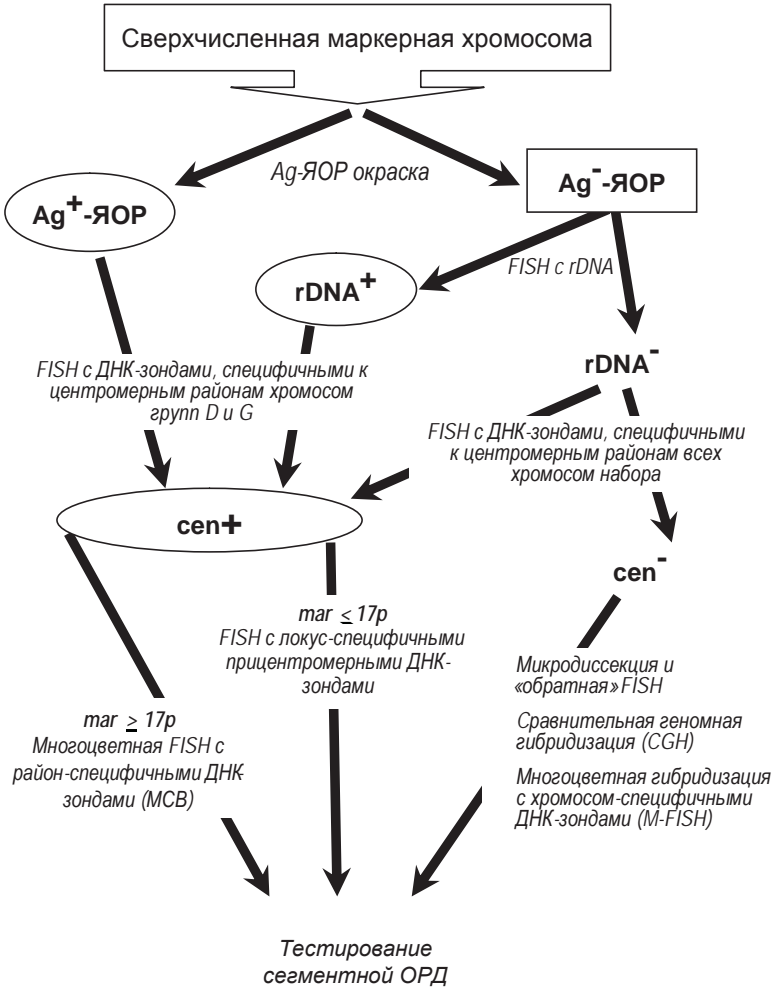


Рис. 9.6. Алгоритм идентификации сверхчисленных маркерных хромосом:
rDNA⁺ — наличие кластеров рибосомных генов;
rDNA⁻ — отсутствие рибосомных генов;
cen⁺ — наличие центромерного района какой-либо из хромосом;
cen⁻ — отсутствие центромерного района какой-либо из хромосом;
17p — короткое плечо хромосомы 17 как репер для оценки размера маркерной хромосомы (*mar*).

устанавливается наличие ядрышкообразующих районов хромосом (ЯОР), для чего используется метод Ag-окраски. Однако известно, что не все ЯОР являются Ag-положительными, то есть содержащими активные кластеры рибосомных генов. В этой ситуации рекомендуется проведение FISH с рДНК-зондом. Следующим шагом в идентификации сателлитных маркеров является установление принадлежности конкретной акроцентрической аутосомы методом FISH с ДНК-зондами, специфическими к прицентромерным районам всех акроцентриков [207]. Несателлитная маркерная хромосома может состоять из материала любого участка генома. Прежде всего, рекомендуется провести FISH с различными прицентромерными ДНК-зондами, что позволит установить ее принадлежность к конкретной хромосоме. Отсутствие сигнала, специфического для прицентромерного района какой-либо из 24 хромосом (22 аутосомы, X и Y), может указывать на наличие у маркерной хромосомы участка с нецентромерной активностью.

Во всех случаях маркерных хромосом необходимо устанавливать наличие эухроматинового материала, что не всегда достигается методами дифференциального окрашивания. Проблемы идентификации маркерных хромосом, особенности методических приемов, включая получение и применение микродиссекционных ДНК-проб, а также различные варианты методов FISH, детально рассмотрены в специальных методических и учебных пособиях [165, 167].

После идентификации в семейной маркерной хромосоме эухроматинового материала необходимо убедиться, что ее наличие в кариотипе плода не приводит к частичной трисомии, а отсутствие — к частичной моносомии по содержащимся в маркере сегментам. В тех случаях, когда маркер является производным хромосом, для которых известен эффект импринтинга, рекомендуется исключение сегментной ОРД.

Общий риск аномалий развития у плода при сверхчисленных маркерных хромосомах, возникших *de novo*, составляет около 8 % для сателлитных маркеров (состоящих из коротких плеч акроцентрических аутосом, несущих рибосомные гены) и 27 % — для несателлитных маркеров [749].

9.7.3.3. Мозаицизм хромосом

Диагностика хромосомного мозаицизма была подробно рассмотрена в главах 4 и 7. В этом разделе обсуждаются оптимальные пути решения

проблем, возникающих при обнаружении на препаратах клеток с различным хромосомным набором. Вероятность такого события в пренатальной диагностике определяется спецификой исследуемого материала и зависит от методов приготовления препаратов. Однако в каждом случае необходимо определить, является ли мозаицизм артефактным, т. е. обусловлен методическими погрешностями, или он реально отражает кариотип плода. Если мозаицизм обнаружен в клетках плаценты, необходимо выяснить, ограничен ли он только этим органом или присутствует в соматических тканях зародыша, то есть является истинным. Особое внимание, которое уделяется мозаицизму в ПД, связано с тем, что в отличие от полных форм хромосомного дисбаланса многие мозаичные трисомии оказываются совместимыми с развитием и живорождением. При этом тяжесть клинических проявлений, в том числе и в пренатальном периоде, не обнаруживает прямой корреляции с представительностью аномальной клеточной линии в тканях, доступных для исследования.

Наиболее наглядным примером артефактного мозаицизма является моносомия, возникающая вследствие утраты хромосом в процессе приготовления препаратов. К разряду артефактов можно отнести и псевдомозаицизм, обусловленный спорадическим нерасхождением хромосом в одной клетке и ее способностью к клонообразованию в условиях *in vitro*. Реальный мозаицизм необходимо отличать от химеризма. Напомним, что химера — это особь, развивающаяся из разных зигот после их слияния.

Обнаружение межклеточных различий по хромосомным наборам может быть также следствием контаминации исследуемого плодного образца клетками материнского происхождения. Риск ошибок, обусловленных контаминацией, составляет 0,16 % при культивировании КАЖ и до 0,4 % при долгосрочном культивировании клеток ворсин хориона. Риск ошибочных результатов снижается при сокращении времени культивирования. При использовании «прямого» метода приготовления препаратов вероятность обнаружения метафазной пластинки из клеток других тканей, кроме клеток цитотрофобласта, крайне мала.

Источником проблем диагностики по лимфоцитам плода является контаминация образца пуповинной крови околоплодными водами и материнской кровью. КАЖ, которые не способны к пролиферации в суспензионной культуре, а также незначительный объем амниотической

жидкости в образце пуповинной крови не влияют на процесс культивирования лимфоцитов. Однако по мере снижения концентрации клеток крови и увеличения объема амниотической жидкости в полученном образце возрастает риск культуральных неудач. К серьезным диагностическим ошибкам обычно приводит примесь материнской крови. Поэтому чрезвычайно важно контролировать чистоту каждого образца пуповинной крови. Во избежание недоразумений тест на контаминацию желательно проводить в присутствии акушера-оператора непосредственно в предоперационной.

Особого внимания заслуживают характер и тип хромосомных аномалий. Так, тетраплоидия, в отличие от других геномных мутаций, обусловлена исключительно нарушением кариотомии и цитотомии при митотическом делении клеток трофобласта. При физиологически прогрессирующей беременности она всегда ограничена плацентой. Тетраплоидные метафазные пластинки, особенно эндомитозы, относительно часто наблюдаются на «прямых» препаратах из хориона и плаценты, а также на препаратах культивированных амниоцитов. Как правило, тетраплоидия представлена мозаичной формой $2n/4n$, однако в некоторых случаях нормальные диплоидные метафазы в анализируемом образце хориона или плаценты могут отсутствовать. В отличие от тетраплоидии, которую в определенной степени можно считать вариантом нормального развития плаценты или же отнести к артефакту при культивировании клеток, триплоидия независимо от формы (полной или мозаичной), всегда сопровождается пороками и задержкой развития плода.

Подозрение на плацентарный мозаицизм должно возникать при обнаружении летальных или сублетальных хромосомных аномалий на препаратах из хориона или плаценты при отсутствии пороков развития у плода. За исключением аутосомных моносомий, которые, как правило, обусловлены методическими артефактами, и тетраплоидии, все остальные случаи мозаичных кариотипов (мозаичная триплоидия, мозаичная трисомия по любой хромосоме набора и моносомия X), независимо от пропорции аномальных клеток, нуждаются в дополнительных исследованиях.

Последовательность диагностических мероприятий представлена на рисунке 9.7. На первом этапе для установления ОПМ желательно провести анализ долгосрочных культур. На втором – анализ

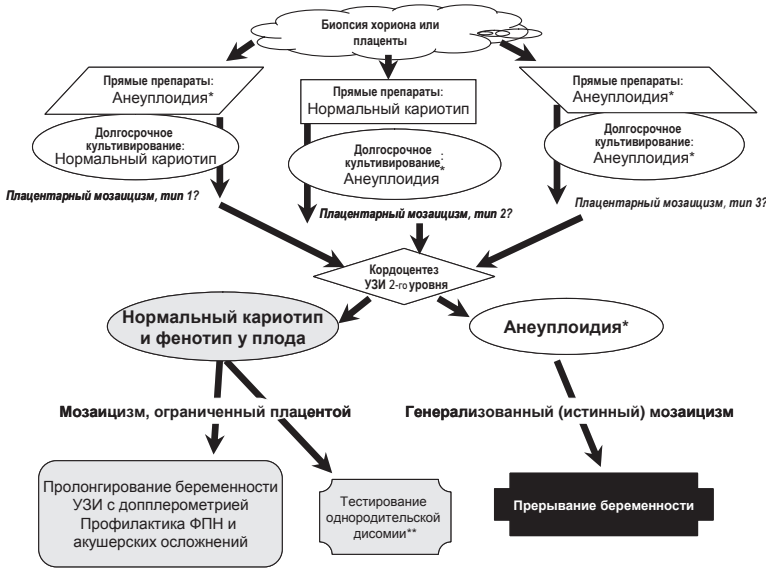


Рис. 9.7. Стандартный диагностический алгоритм при хромосомном мозаицизме в хорионе (плаценте)

* Анеуплоидия, представленная трисомиями по аутосомам, половым хромосомам или моносомией X (в виде полной или мозаичной формы).

** Тестирование однородительской дисомии рекомендуется при ограниченном плацентарном мозаицизме 3-го типа, особенно при мозаичных трисомиях по хромосомам, для которых эффект импринтинга доказан (хромосомы 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20).

хромосомного набора самого плода, для чего производится амниоцентез или — предпочтительнее — кордоцентез. Окончательный диагноз устанавливается только после получения информации о кариотипе в клетках плода.

В зависимости от локализации аномального клона рекомендации могут быть различны. В случае *истинного (генерализованного) мозаицизма* рекомендуется прерывание беременности. При нормальном кариотипе у плода и любом типе плацентарного мозаицизма рекомендуется пролонгирование беременности и УЗИ с доплерометрией в динамике. В случае полной формы анеуплоидии в плаценте, особенно по хромосомам, для которых известны «болезни импринтинга», целесообразно тестирование молекулярными методами однородительской дисомии (ОРД).

9.7.3.4. Однородительская дисомия

Однородительская дисомия возникает при наследовании двух гомологичных хромосом только от одного родителя. Частота ОРД у плода оценивается примерно 8/10 000 развивающихся беременностей [533].

Возможные механизмы образования ОРД по целым хромосомам рассмотрены в главе 7. Напомним, что теоретически «псевдодиплоидный» кариотип с ОРД у плода может оказаться в каждом третьем случае ограниченного плацентарного мозаицизма, т. е. при полной форме анеуплоидии во всех тканях плаценты. Поэтому ОРД у плода должна быть заподозрена во всех случаях ОПМ. Особого внимания в плане ОРД заслуживают трисомии по хромосомам, содержащим кластеры импринтированных генов (хромосомы 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20).

Верификация ОРД у плода при мозаичном статусе трисомии по хромосомам 2, 4 и 5 в плаценте не столь целесообразна, так как ее негативное влияние на развитие плода не доказано [868]. Подозрение на ОРД должно возникать также и в случаях отсутствия гетероморфизма (т. е. морфологической идентичности) гомологов по районам гетерохроматина или ядрышковых организаторов. Уместно отметить, что ни подтвердить, ни исключить ОРД цитогенетическими методами невозможно. Для тестирования ОРД используются молекулярно-генетические методы, рекомендуемые для пренатальных исследований [121]. Диагностика ОРД в этих случаях основана на сравнительном анализе образцов ДНК из крови родителей и плода, что предполагает проведение кордоцентеза. Последовательность диагностических мероприятий для верификации ОРД у плода при плацентарном мозаицизме представлена на рисунке 9.8. Рекомендации по дальнейшему ведению беременности могут быть различными — пролонгирование беременности под УЗ-наблюдением при исключении ОРД или прерывание беременности в случае подтверждения ОРД у плода.

9.7.4. Алгоритм пренатальной диагностики хромосомных болезней

На основе многолетнего опыта нами разработан алгоритм и предложена оптимальная схема инвазивной ПД хромосомных болезней (рис. 9.9). Ее важными составляющими являются: 1) приготовление хромосомных препаратов «прямым» способом и анализ дифференци-

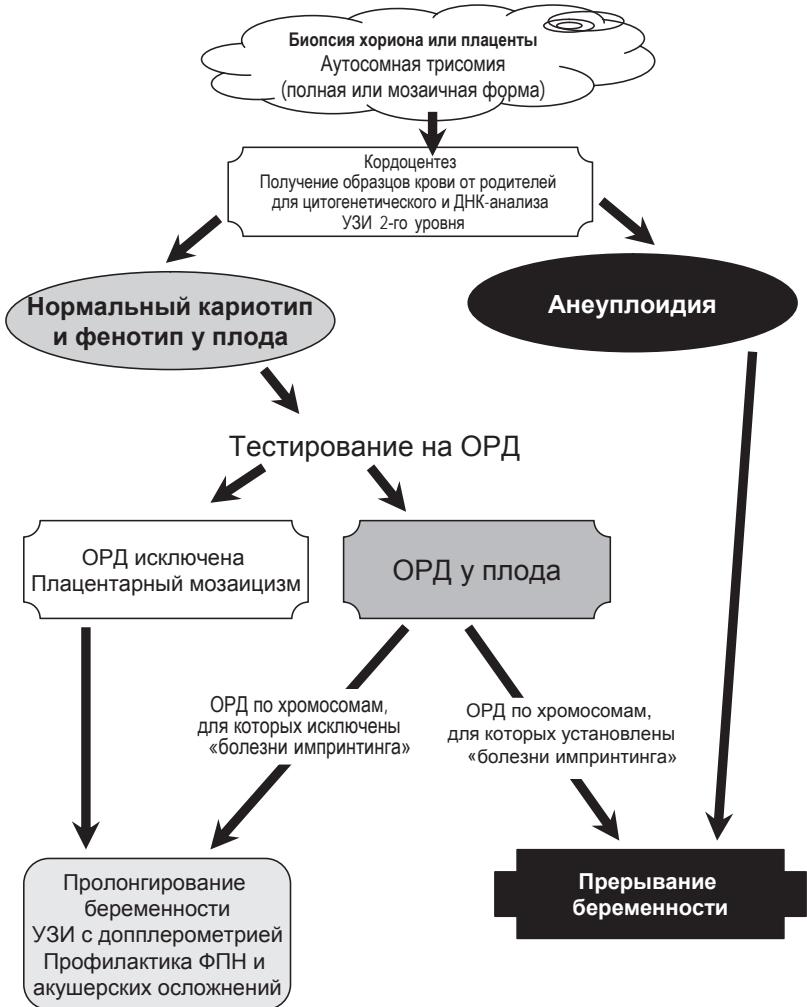


Рис. 9.8. Диагностический алгоритм при подозрении на однородительскую дисомию у плода

ально окрашенных хромосом уже через 3–4 часа после хорион- или плацентобиопсии; 2) кариотипирование с использованием системы анализа изображений в интерактивном режиме; 3) реальные условия для диагностики моногенных и хромосомных болезней на одном образце плодного материала.

Алгоритм состоит из нескольких последовательных этапов (рис. 9.9). Цитогенетический анализ начинается с анализа дифференциально окрашенных хромосом на «прямых» препаратах из хориона или плаценты. При нормальном кариотипе у плода рекомендуется продолжение беременности. При недостаточной митотической активности в клетках цитотрофобласта рекомендуется повторная биопсия. В случае однотипной хромосомной патологии во всех проанализированных метафазных пластинках рекомендуется прерывание беременности.

При обнаружении в образцах хориона или плаценты структурных перестроек или сверхчисленных маркерных хромосом обязательным этапом обследования является кариотипирование родителей и УЗИ второго или экспертного уровня. Как правило, предлагается проведение кордоцентеза для уточнения кариотипа плода. Аналогичная тактика (УЗИ второго или экспертного уровня и кордоцентез) целесообразна и в случаях обнаружения хромосомного мозаицизма в плаценте. По результатам кордоцентеза с учетом данных УЗИ рекомендуется продолжение беременности или, в случае подтверждения патологии, ее прерывание.

Если показанием к инвазивной ПД является высокий риск моногенной болезни у плода, то после исключения основного диагноза методами ДНК-диагностики, целесообразно провести анализ кариотипа у такого плода. Сочетание моногенной болезни и патологии кариотипа у одного и того же плода, в действительности, встречается не так редко. В частности, нами зарегистрировано несколько случаев хромосомной патологии плода у беременных, направленных на ПД гемофилии, миодистрофии Дюшенна, муковисцидоза и фенилкетонурии. Поэтому во избежание повторных инвазивных вмешательств при планировании ПД моногенных болезней необходимо предусмотреть получение материала, пригодного не только для ДНК-диагностики, но и цитогенетического анализа.

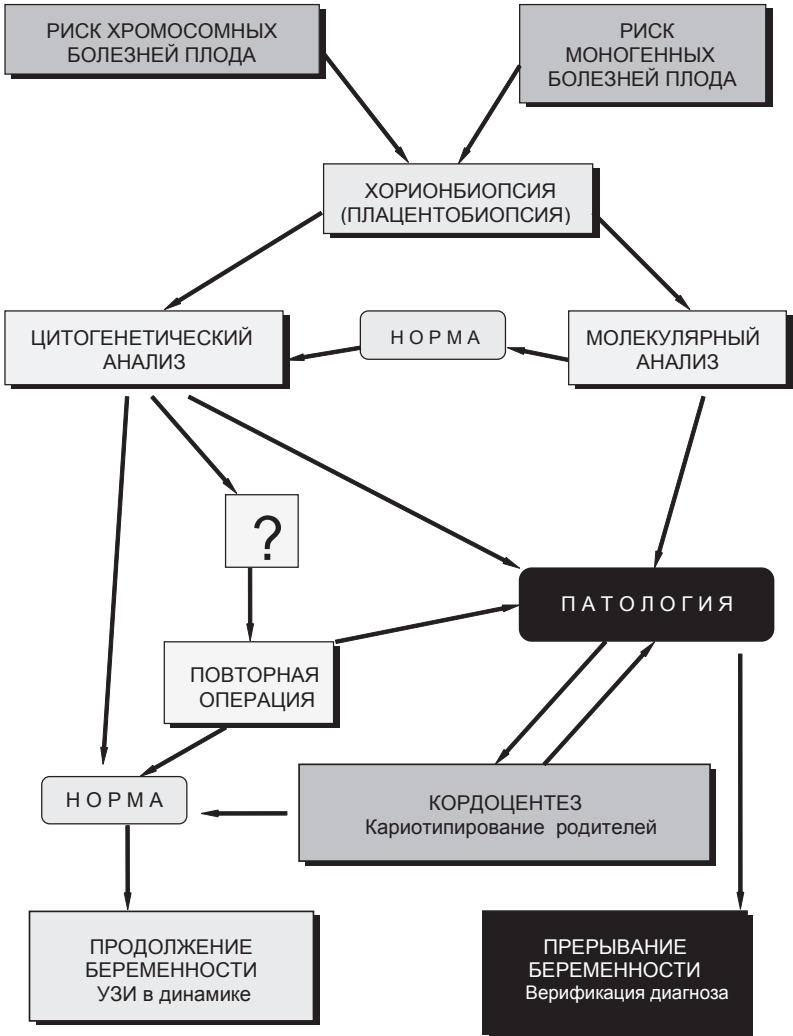


Рис. 9.9. Принципиальная схема инвазивной пренатальной диагностики наследственных болезней

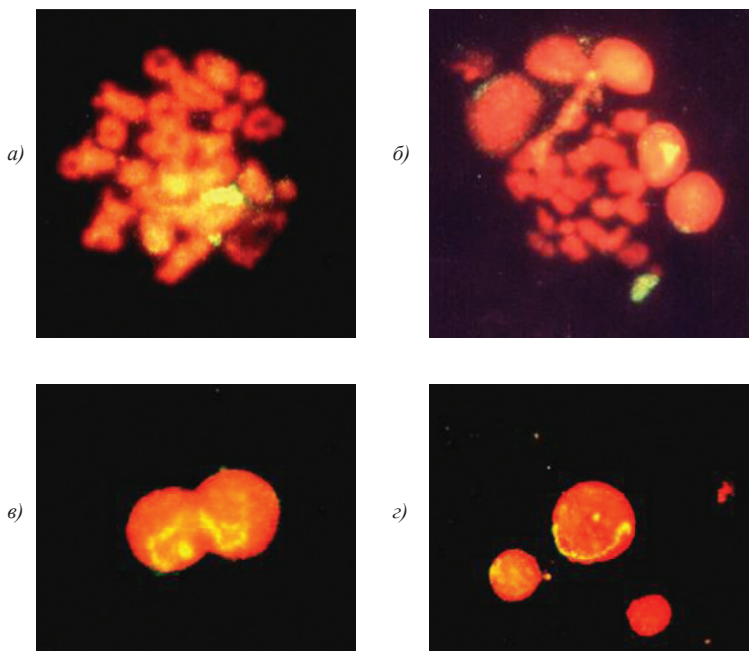


Рис. 4.3. Клетки сперматогенного ряда из образца эякулята пациента с кариотипом 46,XY и микроделецией в локусе AZF (а – стадия диакинеза; б – метафаза I; в, г – сперматоциты II). FISH с цельнохромосомным ДНК-зондом к хромосоме X

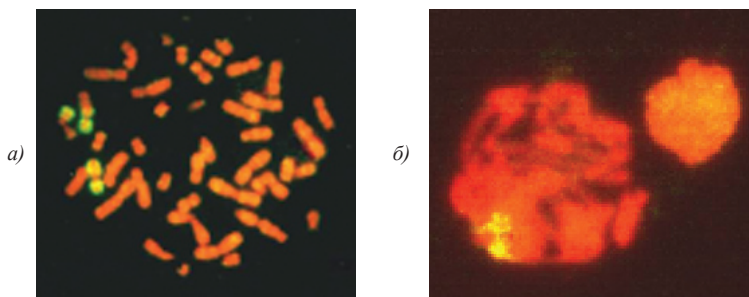
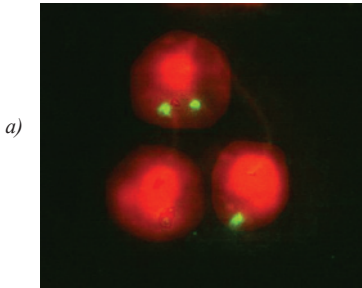
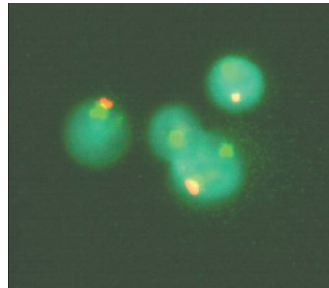


Рис. 4.4. Метафазная пластинка из ФГА-стимулированного лимфоцита периферической крови (а) и сперматоцит I из образца эякулята (б) от пациента с кариотипом 46,XY,t(9;13). FISH с цельнохромосомным ДНК-зондом к хромосоме 9



а)



б)

Рис.4.6. Сперматозоиды из образцов эякулята от пациента с нарушениями параметров спермограммы. А -FISH с использованием ДНК-зонда D18Z1, б – двухцветная FISH с использованием ДНК-зондов, специфичных к прицентромерным районам хромосом 18 (D18Z1, FITC) и X (DXZ1, TRITC)

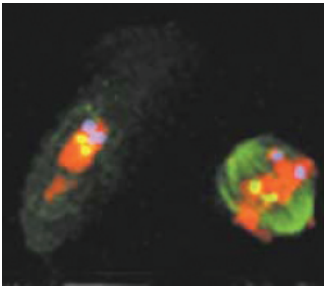


Рис.4.12. Ооцит, блокированный на стадии метафазы II (справа) и первое полярное тельце (слева). Иммунофлуоресцентная детекция антитубулина (зеленая флуоресценция) и FISH с прицентромерными ДНК-зондами к хромосомам X (желтый сигнал) и 18 (голубой сигнал) [457]

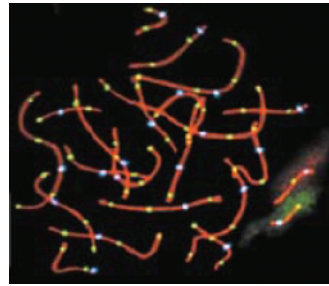


Рис.4.13. Сперматоцит человека на стадии пахитены. Одновременная детекция синаптонемных комплексов (иммунофлуоресцентная детекция белка SCP3, красный сигнал), сайтов рекомбинации (иммунофлуоресцентная детекция белка MLH1, зеленый сигнал) и центромерных районов хромосом (иммунофлуоресцентная детекция белка CREST, голубой сигнал) [457]

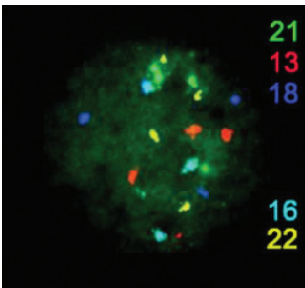


Рис.4.14. Мультиплексная FISH с ДНК-зондами, специфичными к прицентромерным районам хромосом 13, 16, 18, 21 и 22 (указаны соответствующим гибридационному сигналу цветом) на изолированном бластомере от триплоидного эмбриона (любезно предоставлено С.Мackie Ogilvie, Gay Hospital, London)

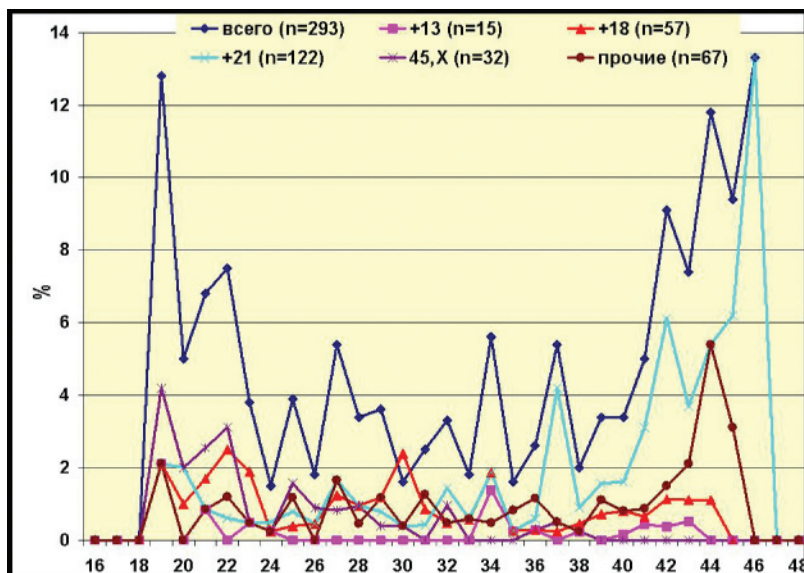


Рис.6.1. Частота гетероплоидии у плодов в зависимости от возраста матери (по результатам пренатального кариотипирования в 10-26 недель беременности без учета показаний к инвазивной пренатальной диагностике). По оси абсцисс – возраст беременной (в годах), по оси ординат – частота плодов с геномными мутациями (в % от общего числа пренатальных диагностик, выполненных в каждой возрастной группе). Группа “Прочие” объединяет случаи 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY, триплоидии, а также аутосомные трисомии 7, 9, 22

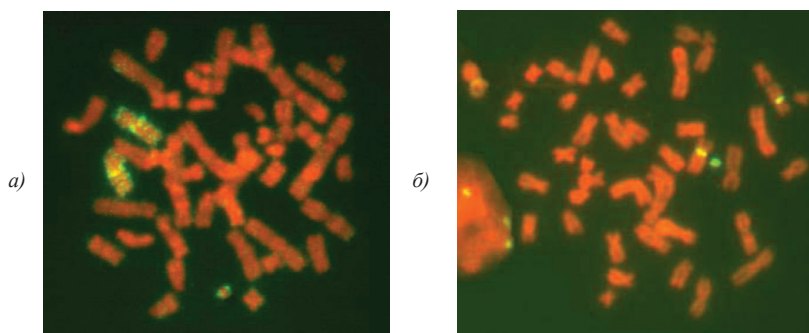


Рис. 6.10. Идентификация маркерной хромосомы *der* (7). Метафазные пластинки из ФГА-стимулированных лимфоцитов: FISH с ДНК-зондом, специфичным к прицентромерному району хромосомы 7 (а) и с цельнохромосомным ДНК-зондом 7 (б)

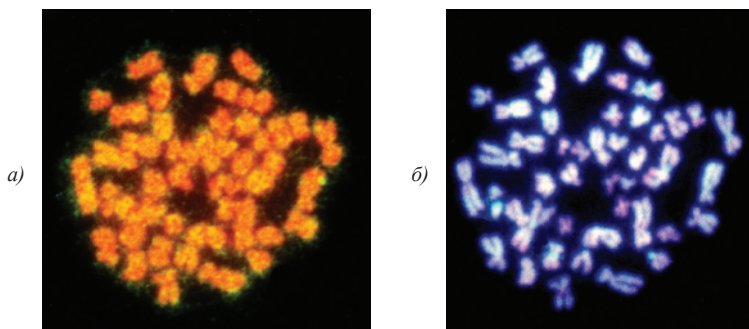


Рис.10.11. Метафазная пластинка на препарате из почки эмбриона человека (аутопсийный материал от медицинского абортуса, беременность 9 недель): а – ник-трансляция *in situ* с преобработкой ДНКазой и 2-кратной амплификацией сигнала (FITC, желтый; окраска йодистым пропидием); б – окраска DAPI

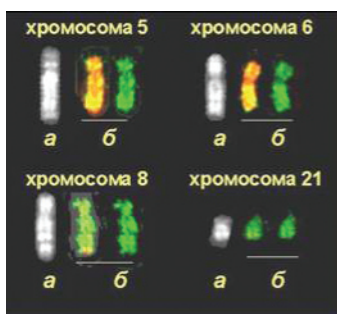


Рис. 10.12. Общность рисунка линейной дифференцированности метафазных хромосом из эмбриональных клеток человека при различных способах воздействия: а – метод RBA (хромосомы из ФГА-стимулированных лимфоцитов пуповинной крови, полученных при кордоцентезе в 22 недели беременности); б – метод ник-трансляции *in situ* с преобработкой HpaII (хромосомы из эмбриональных клеток медицинского абортуса 5/6 недель беременности, слева - FITC+PI, справа - FITC)

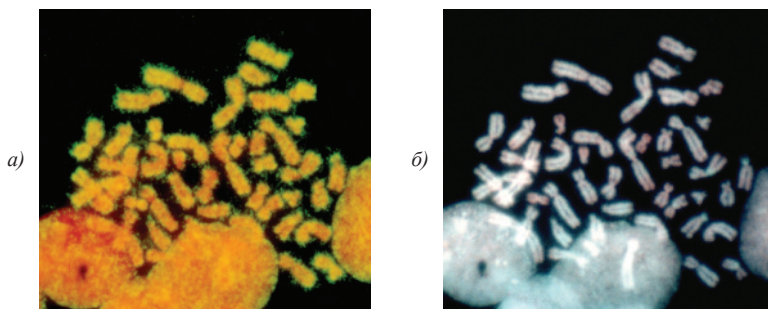


Рис.10.13. Метафазная пластинка из клеток цитотрофобласта хориона (аутопсийный материал от медицинского абортуса, беременность 9 недель): а – ник-трансляция *in situ* с преобработкой ДНКазой I и 2-кратной амплификацией сигнала (FITC+PI), б – окраска DAPI

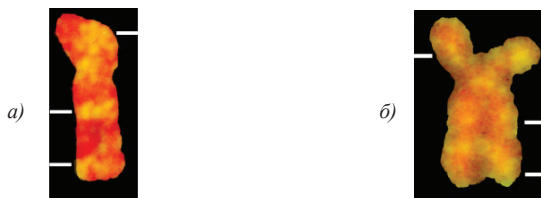


Рис.10.15. Распределение ник-трансляционного сигнала (желтый) на метафазной хромосоме 11 из клеток цитотрофобласта хориона после предобработки Нра II (а) и ДНКазы I (б). Указаны районы Т-сегментов (11p15, 11q13, 11q23)



Рис.10.17. Различия в интенсивности флуоресценции ник-трансляционного сигнала в районе 15q11-q13 (предобработка Нра II) на гомологичных хромосомах из метафазной пластинки (аутопсийный материал почки от медицинского абортуса, беременность 6/7 недель). Регистрация изображений каждого из гомологов в последовательности слева направо – DAPI, FITC+PI, FITC, PI

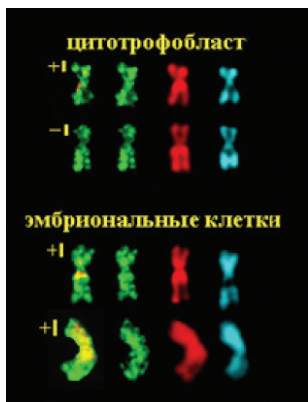


Рис.10.18. Метафазные хромосомы 11 из цитотрофобласта хориона и эмбриональных клеток (аутопсийный материал от медицинского абортуса, беременность 8/9 недель) после ник-трансляции *in situ* с предобработкой Нра II. Гомологи хромосомы 11 из метафазных пластинок соответствующих тканей расположены по вертикали. Регистрация изображений каждой из хромосом в последовательности слева направо – FITC+PI, FITC, PI, DAPI. Наличие ник-трансляционного сигнала в районе 11p15 отмечено знаком «+», отсутствие сигнала – знаком «-»

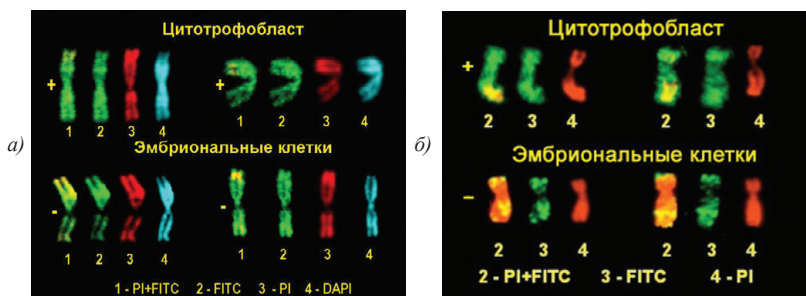


Рис.10.19. Межтканевые различия по интенсивности ник-трансляционного сигнала в районах 1qh (а), 9qh (б) и 16qh (в) (предобработка эндонуклеазой HpaII). По горизонтали представлены видеозображения гомологичных хромосом из метафазных пластинок соответствующих тканей. Наличие ник-трансляционного сигнала в районах конститутивного гетерохроматина отмечено знаком «+», отсутствие сигнала – знаком «-»

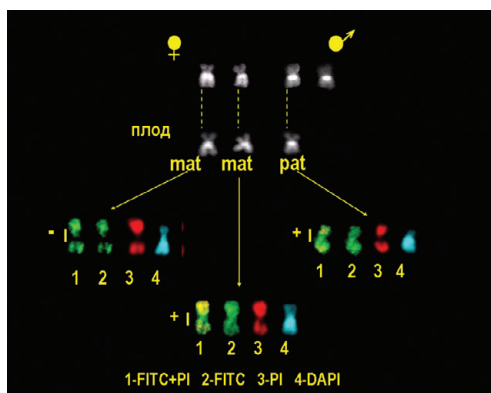
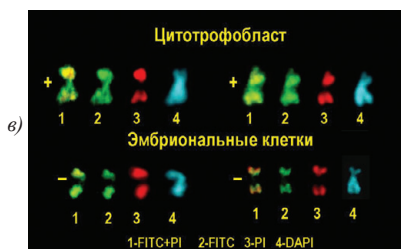


Рис.10.20. Различия в характере метилирования района 16qh в клетках цитотрофобласта (кариотип 47,X,Y,+16). (а) гомологи хромосом 16 из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови родителей (окраска DAPI); (б) триада хромосом 16 из клеток цитотрофобласта (окраска DAPI); (в) хромосомы 16 из клеток цитотрофобласта (ник-трансляция in situ, опосредованная HpaII). Наличие ник-трансляционного сигнала в районе 16qh отмечено знаком «+», отсутствие – знаком «-»

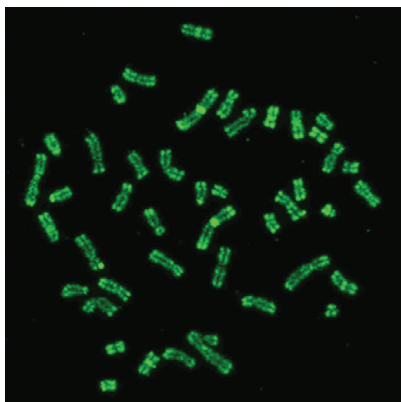


Рис.10.22. Метафазная пластинка из ФГА-стимулированного лимфоцита периферической крови (кариотип 46,XX). Иммунофлуоресцентная детекция 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител и FITC-конъюгированных вторичных антител

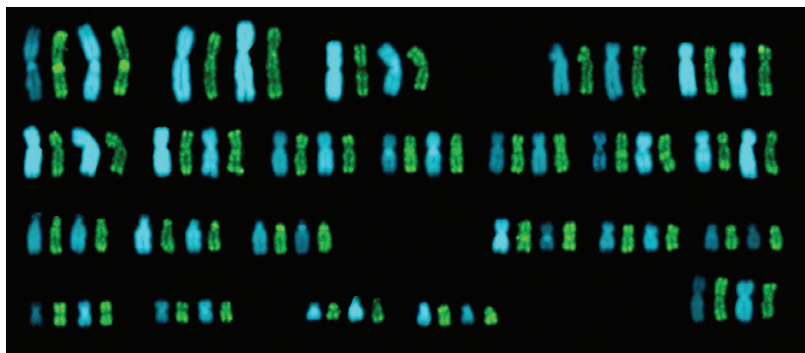


Рис.10.23. QFISH-сегментация и распределение 5-метилцитозина на метафазных хромосомах из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови (совмещенная кариограмма). Видеоизображения хромосом получены при последовательной обработке одной метафазной пластинки флуорохромом Hoechst 33258 с контрастированием актиномицином D (голубой) и флуоресцентной детекции 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител (FITC, зеленый)

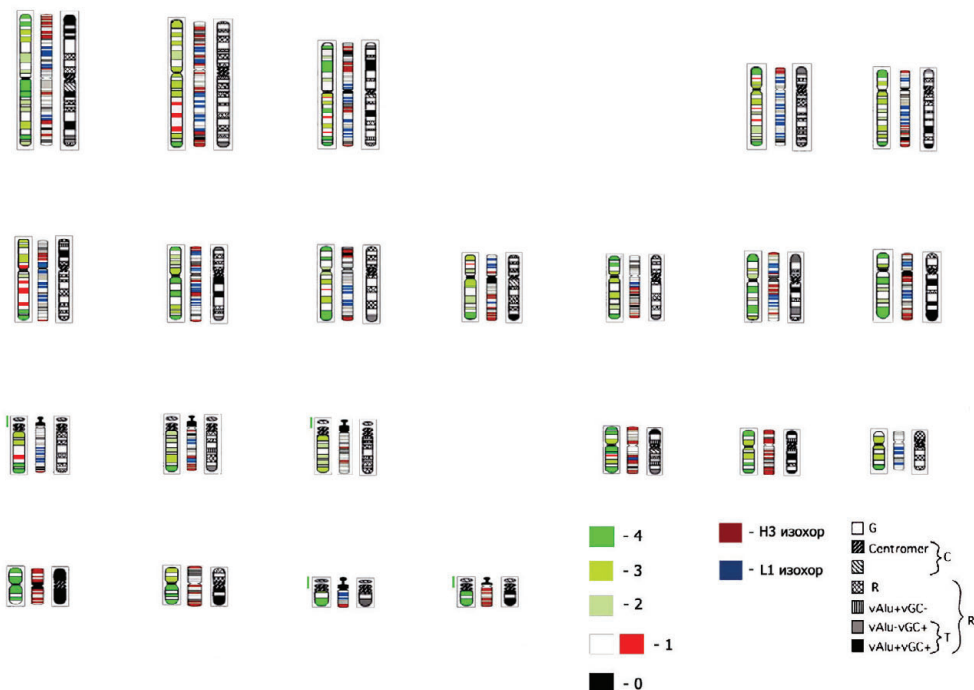


Рис.10.24. Комплексная характеристика цитохимической неоднородности аутосом человека. Слева – идиограмма M-сегментации при уровне разрешения 400 сегментов на гаплоидный геном [145]. Три оттенка зеленого, белый и черный отражают степень обогащенности 5-метилцитозина, оцененную по 5-балльной системе. Красным отмечены R-сегменты, сопоставимые с G-сегментами по содержанию 5-метилцитозина В центре – схема распределения тяжелого (H3) и легкого (L1) изохор (уровень разрешения 850 сегментов) [772]. Справа – идиограмма R-сегментации (уровень разрешения 400 сегментов) [473]. Степень обогащенности GC-парами оснований и Alu-повторами отмечена различной штриховкой. Пояснения в тексте

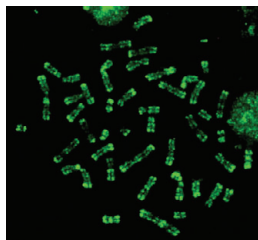


Рис.10.25. Метафазная пластинка из ФГА-стимулированного лимфоцита пуповинной крови (кариотип 46,XX), полученной при кордоцентезе в 22 недели беременности. Иммунофлуоресцентная детекция 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител

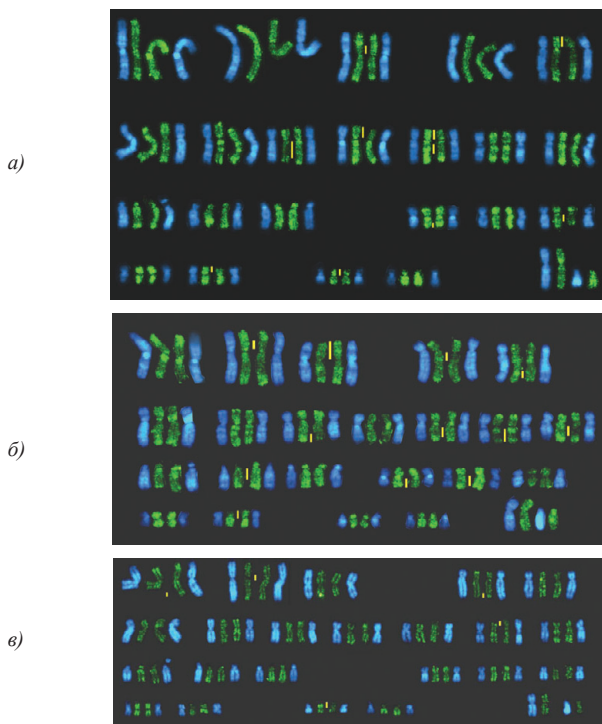


Рис.10.26. QFV-рисунок и M-сегментация метафазных хромосом цитотрофобласта и эмбриональных клеток (совмещенная кариограмма). Препараты некультивированных клеток печени (а), мозга (б) и хориона (в) из аутопсийного материала от медицинский абортуса 5/6 недель развития. Видеоизображения хромосом получены при последовательной обработке метафазной пластинки флуорохромом Hoechst 33258 с контрастированием актиномицином D (голубой) и флуоресцентной детекции 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител (FITC, зеленый). Указаны районы AT-MeC между гомологами

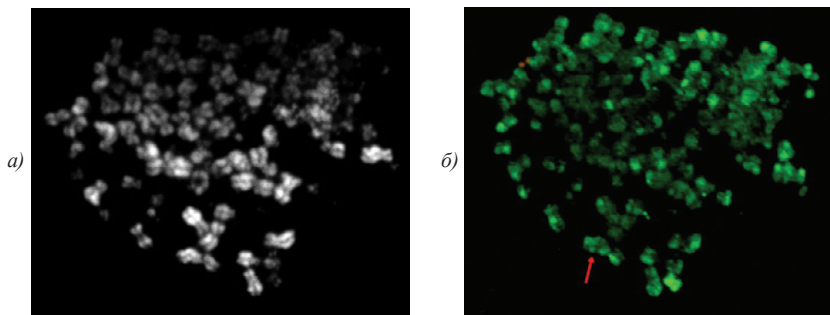


Рис.10.27. Фрагмент метафазной пластинки из бластомера триплоидного 2-клеточного эмбриона человека. Метод QFH (а) и иммунофлуоресцентная детекция 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител, FITC (б). Красной стрелкой указан сестринский хроматидный обмен в длинном плече хромосомы 2

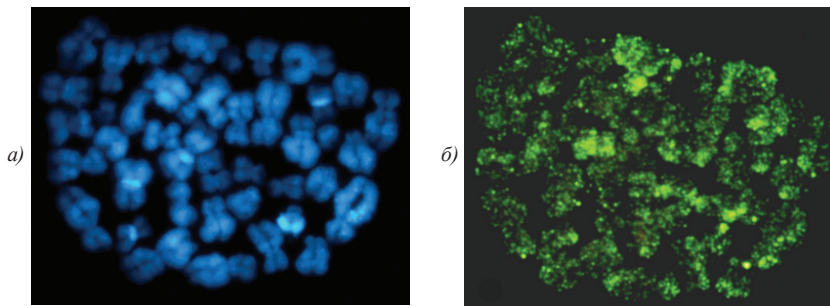


Рис.10.28. Фрагмент метафазной пластинки из бластомера триплоидного 4-клеточного эмбриона человека. Метод QFH (а) и иммунофлуоресцентная детекция 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител, FITC (б)

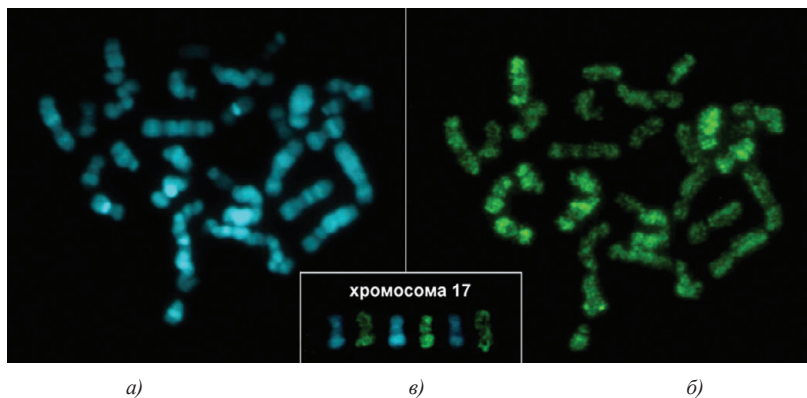


Рис.10.29. Метафазные хромосомы из бластомера триплоидного 8-клеточного эмбриона человека. Фрагмент метафазной пластинки (а, б) и гомологи хромосомы 17 (в). *QFH* (голубой), *FITC* (AT-5MeC, зеленый)

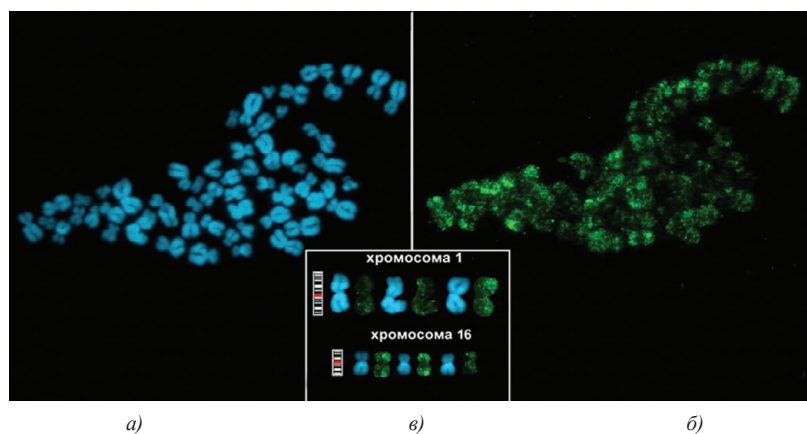


Рис.10.30. Метафазные хромосомы из бластомера триплоидного 8-клеточного эмбриона человека. Фрагмент метафазной пластинки (а, б) и гомологи хромосомы 1 и 16 (в). *QFH* (голубой), *FITC* (AT-5MeC, зеленый). На идиограмме *Q*-исчерченности гетерохроматиновые районы 1q12 и 16q11.2 отмечены красным

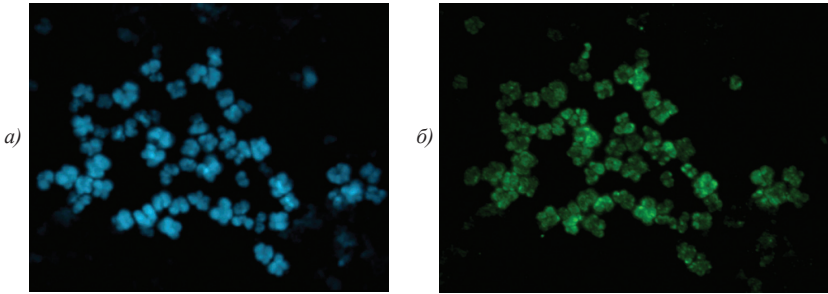


Рис.10.31. Фрагмент метафазной пластинки из клеток триплоидной бластоцисты. Метод QFH (а) и иммунофлуоресцентная детекция 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител, FITC (б)

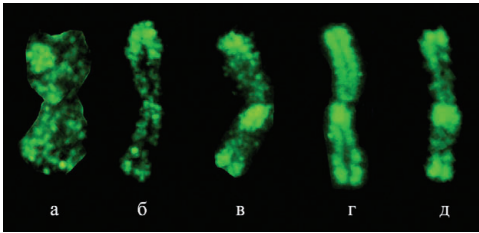


Рис.10.32. Тканеспецифичный и стадийспецифичный паттерн метилирования метафазной хромосомы 1 (иммунофлуоресцентная детекция 5-метилцитозина с помощью моноклональных антител, FITC): М-сегментация хромосомы 1 из триплоидного бластомера эмбриона человека (а); диплоидных клеток цитотрофобласта хориона (б) легкого (в), печени (г) и лимфоцита пуповинной крови (д). Сроки развития: первые деления дробления (а), 5-6 недель (б, в, г) и 22 недели (д) беременности

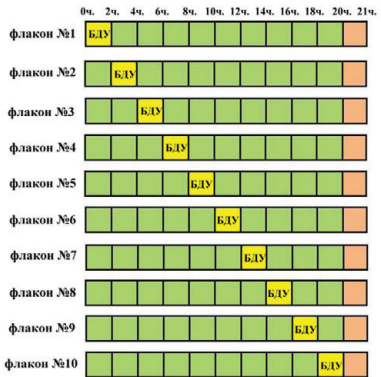


Рис.10.34. Схема инкубации ворсин хориона и фрагментов эмбриональных тканей с импульсным добавлением БДУ. Зеленым цветом обозначена инкубация материала в культуральной среде при температура 37 °С; желтым – инкубация биоптатов с БДУ; красным – инкубация с колхицином

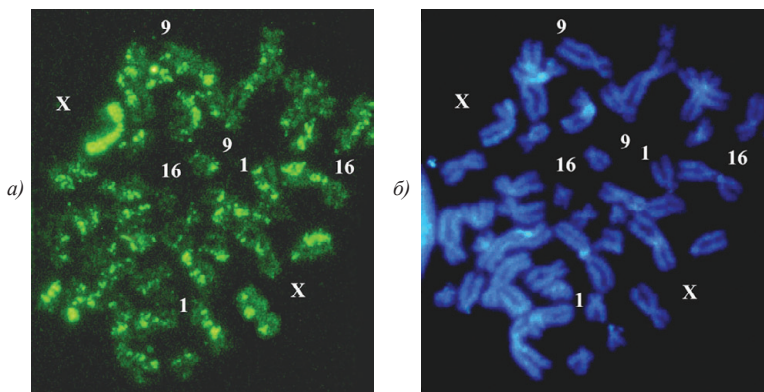


Рис.10.35. Распределение флуоресцентного сигнала в метафазных хромосомах из клетки цитотрофобласта (46,XX) после импульсного введения БДУ во второй половине S-периода: (а) иммунофлуоресцентная детекция БДУ (FITC); (б) окрашивание флуорохромом DAPI

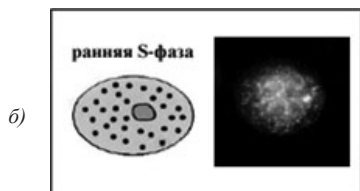
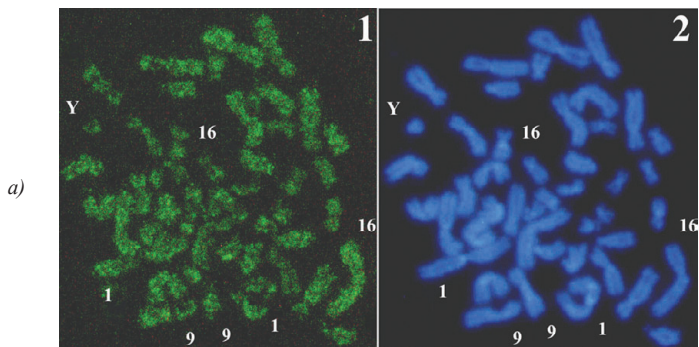


Рис.10.36. Особенности репликации хроматина в ранней S-фазе клеточного цикла. Иммунофлуоресцентная детекция АТ-БДУ на метафазных хромосомах из клетки цитотрофобласта (а, слева) и белка PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) на интерфазном ядре из клетки лимфоцита человека (б, [381])

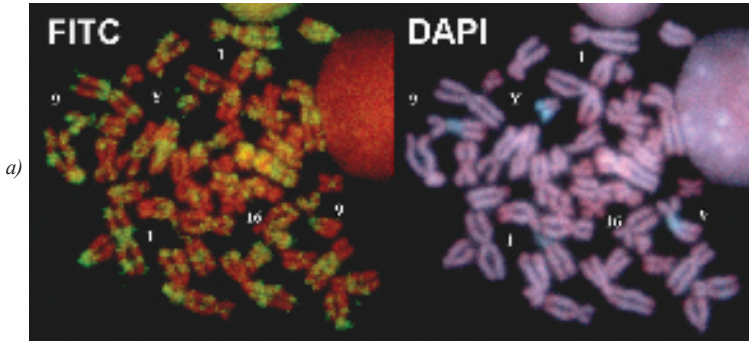


Рис.10.37. Особенности репликации хроматина во второй половине S-фазы клеточного цикла. Иммунофлуоресцентная детекция АТ-БДУ на метафазных хромосомах из клетки цитотрофобласта человека (а, слева) и белка PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) на интерфазном ядре из клетки лимфоцита человека (б, [381])

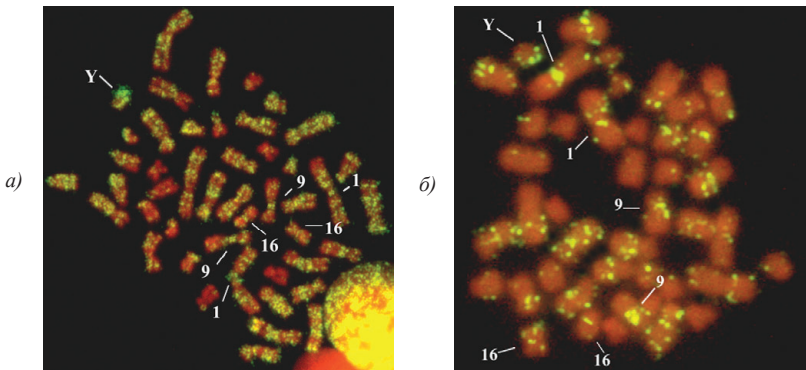
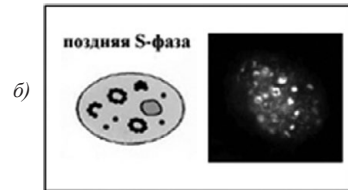


Рис.10.38. Различия в распределении флуоресцентного сигнала в метафазных хромосомах из клеток цитотрофобласта (а) и эмбриональных клеток (б) после импульсного введения БДУ во второй половине S-периода. Иммунофлуоресцентная детекция БДУ (FITC)

9.8. Принципы и методы диагностики моногенных болезней

В настоящее время диагностика практически всех моногенных болезней проводится с использованием молекулярных методов, называемых также методами ДНК-анализа (отсюда часто упоминаемая в современной научной литературе «ДНК-диагностика»). Принимая во внимание их высокую точность и большую чувствительность, необходимо помнить, что эффективность пренатальной ДНК-диагностики в значительной мере предопределяется соблюдением следующих основных требований.

1. Точностью клинического диагноза.
2. Своевременным обследованием семьи высокого риска и больного молекулярными методами.
3. Правильностью оценки риска рождения больного ребенка.
4. Выбором оптимального срока ПД.
5. Возможностью получения материала плода.
6. Четкостью рекомендаций после ПД.
7. Наличием скринирующих программ в ДНК-диагностике.

Основу методов ДНК-диагностики, направленных на идентификацию мутаций или молекулярное маркирование мутантных хромосом, составляет *полимеразная цепная реакция (ПЦР)* синтеза ДНК. Метод позволяет избирательно синтезировать (амплифицировать) *in vitro* относительно небольшие участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие исследуемую (амплифицируемую) последовательность. Метод ПЦР — один из основных в молекулярной диагностике наследственных болезней. Разработаны и широко используются на практике различные варианты данного метода, позволяющие быстро и эффективно идентифицировать мутации, изучать ДНК-полиморфизмы, применяемые для молекулярного маркирования мутантных хромосом.

В настоящее время существуют два основных подхода к ПД, равно как вообще к диагностике генных болезней.

Прямая диагностика, основанная на непосредственной идентификации мутаций в определенном гене.

Косвенная (непрямая) диагностика — маркирование мутантного гена (иногда называемая маркированием «больной» хромосомы, несущей мутантный ген) с помощью молекулярных маркеров.

Подробно принципы и методы молекулярной диагностики изложены в соответствующих главах наших монографий и методических рекомендаций [14, 44, 69, 133, 151].

В настоящее время молекулярной диагностике в России доступно свыше 40 различных, в том числе и наиболее частых моногенных наследственных болезней. Список этих заболеваний, с указанием центров, где такая диагностика проводится, приведен в таблице 9.8. Отметим в заключение, что для практических врачей важно не только руководствоваться этой информацией при направлении женщин групп риска на ПД этих заболеваний, но и помнить о том, что эффективная ПД моногенных заболеваний требует обязательного предварительного обследования таких семей на информативность до беременности (для решения вопроса о том, на каком сроке беременности и каким способом будет проведена такая диагностика). Главное при этом учесть необходимость своевременного молекулярного обследования больного ребенка или, по крайней мере, сохранить пятно крови на фильтре или парафиновые блоки секционного материала для исследования его ДНК.

9.9. Прерывание беременности и верификация диагноза

При выявлении хромосомной или генной патологии обязательным этапом ПД является консультирование женщины с предоставлением ей всей информации о прогнозе жизни ребенка в случае его рождения. Важно, что решение вопроса о сохранении или прерывании беременности женщина принимает самостоятельно. Конечно, ее решение во многом определяется объективностью консультирования по результатам диагностики.

Важным этапом ПД является верификация диагноза. В случае верификации диагноза хромосомной патологии плода необходимо не только подтвердить хромосомную аномалию, но и провести патоморфологическое изучение абортуса. Учитывая отсутствие общепринятой схемы комплексного исследования плодов с хромосомными aberrациями, эмбриологические и цитогенетические особенности хориона, а также опыт, накопленный при исследовании сложных случаев, нами разработана собственная схема верификации пренатального диагноза (рис. 9.10). Схема предусматривает активное участие патоморфолога, врача-генетика, врача УЗД, цитогенетика и молекулярного биолога.

Таблица 9.8. Моногенные болезни, диагностируемые молекулярными методами в России (с указанием медицинских диагностических центров)

№ п/п	Наследственные заболевания	Медицинские центры
1	Агаммаглобулинемия	МГНЦ
2	Адреногенитальный синдром	ИАГ, ГНЦ, МГНЦ, ЦОЗМиР
3	Альбинизм тип ОСА1	МГНЦ
4	Альпорта синдром	ГНОКДЦ, МНГЦ
5	Альфа-1-антитрипсина недостаточность	ИЭМ
6	Амиотрофия спинальная Верднига–Гоффмана, Кугельберга–Веландера	ИАГ, МГНЦ, ТИМГ
7	Амиотрофия невральная Шарко–Мари–Тус	МГНЦ, ТИМГ, УНЦ
8	Амиотрофия спинальная X-сцепленная	МГНЦ
9	Анжельмана синдром	МГНЦ, ТИМГ
10	Апера синдром	МГНЦ
11	Атаксия Фридрейха	МГНЦ
12	Ахондроплазия	МГНЦ
13	Беквита–Видемана синдром	МГНЦ
14	Бета-талассемия	ГНЦ
15	Виллебранда болезнь	ГНЦ, ИАГ
16	Врожденная контрактурная арахнодактилия	МГНЦ
17	Врожденная мышечная дистрофия, тип Фукуяма	МГНЦ
18	Гемофилия А	ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ, ТИМГ
19	Гемофилия В	ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ, ТИМГ
20	Гепатолентикулярная дегенерация (болезнь Вильсона–Коновалова)	МГНЦ
21	Гиперхолестеринемия семейная	ГНОКДЦ, ИЭМ
22	Гипофизарный нанизм (дефицит гормона роста)	МГНЦ
23	Гликогенозы	МГНЦ
24	Глухота нейросенсорная несиндромальная	МГНЦ
25	Грейга синдром	МГНЦ
26	Дефицит ацил-КоА дегидрогеназы	МГНЦ
27	Длинного QT синдром	МГНЦ, ТИМГ, УНЦ
28	Жильбера синдром	МГНЦ
29	Зонулярная катаракта	МГНЦ
30	Коффина–Лоури синдром	МГНЦ
31	Криглера–Найара синдром	МГНЦ
32	Лимфопролиферативный синдром, X-сцепленный (болезнь Дункана, синдром Пуртильо)	МГНЦ
33	Лимфидема Минроя	МГНЦ
34	Луи–Барр синдром (телеангиоэктазия)	МГНЦ
35	Леш–Нихана синдром	ИАГ
36	Мартина–Белл (ломкой X-хромосомы) синдром	ИАГ, ТИМГ
37	Марфана синдром	МГНЦ

Таблица 9.8. (продолжение)

№ п/п	Наследственные заболевания	Медицинские центры
38	Миллера–Дикера синдром	МГНЦ
39	Милроя синдром	МГНЦ
40	Миодистрофия Дюшенна–Беккера	ГНОКДЦ, ИАГ, МГНЦ, ТИМГ, УНЦ
41	Миодистрофия Эмери–Дрейфуса	МГНЦ
42	Миотоническая дистрофия	ИАГ, МГНЦ
43	Муковисцидоз	ГНОКДЦ, ИАГ, ИЭМ, МГНЦ, ТИМГ, УНЦ
44	Мукополисахаридозы	МГНЦ
45	Несиндромальная нейросенсорная тугоухость	МГНЦ, УНЦ, ТИМГ
46	Ниймегена синдром	МГНЦ
47	Норри болезнь	МГНЦ
48	Окулофарингеальная миодистрофия	МГНЦ
49	Периодическая болезнь	МГНЦ
50	Псевдоахондропластическая дисплазия	МГНЦ
51	Прадера–Вилли синдром	ИАГ, МГНЦ, ТИМГ
52.	Рецессивный поликистоз почек	МГНЦ
53	Ретинобластома	МГНЦ
54	Смита–Лемли–Опитца синдром	МГНЦ
55	Спастическая параллегия Штрюмпеля	МГНЦ
56	Спинобульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди)	ИАГ, МГНЦ, НИИН, ТИМГ
57	Тестикулярной феминизации синдром	ИАГ, ТИМГ, УНЦ, МГНЦ
58	Унферрихта–Лундберга болезнь	МГНЦ
59	Фенилкетонурия	ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ, МГНЦ, ТИМГ
60	Хантера болезнь	ИАГ
61	Хольт–Орана синдром	МГНЦ
62	Хорея Гентингтона	ИАГ, МГНЦ, НИИН
63	Эктодермальная ангидротическая дисплазия	МГНЦ
64	Элерса–Данло (классический тип) синдром	МГНЦ

Примечание:

ГНОКДЦ — Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр, г. Новосибирск.

ГНЦ — Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва.

ИАГ — ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, г. Санкт-Петербург.

ИЭМ — НИИ экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург.

МГНЦ — ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва.

НИИН — Научно-исследовательский институт неврологии РАМН, г. Москва.

ТИМГ — НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск.

УНЦ — Уфимский научный центр, г. Уфа.

ЦОЗМиР — Центр охраны здоровья матери и ребенка, г. Москва.

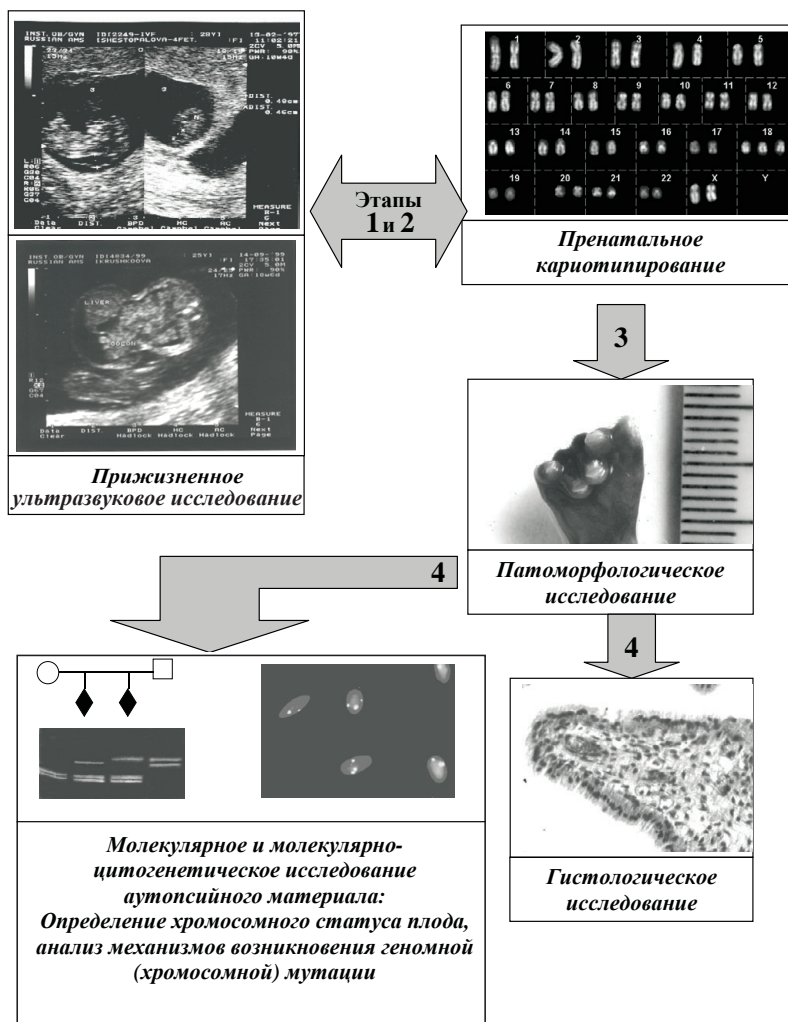


Рис. 9.10. Принципиальная схема верификации хромосомных болезней у плода

После установления факта хромосомного дисбаланса у плода беременной рекомендуется детальное ультразвуковое исследование высокого уровня. Повторное УЗИ плода с установленным цитогенетическим диагнозом позволяет выявить аномалии развития у плода, не отмеченные при первичном осмотре.

После прерывания беременности в I триместре проводится цитогенетический анализ хромосомных препаратов из тканей и органов абортусов с использованием традиционных цитогенетических методов, а также методов гибридизации *in situ* (методы FISH) и молекулярных методов. Весьма желателен уже на этом этапе патоморфологический анализ материала абортуса.

После искусственного прерывания беременности во II триместре возможности цитогенетической диагностики ограничены вследствие аутолиза большинства тканей плода. Лаборатории, где хорошо налажены методы культивирования тканей, могут применить эти методы для верификации кариотипа плода, однако успешность попыток культивирования мацерированных тканей невелика. Обязательным является детальный патоморфологический анализ в соответствии с протоколом исследования случаев антенатальной гибели плода.

9.10. Эффективность пренатальной диагностики

Считается, что ПД относится к числу высокоэффективных направлений профилактической медицины, где отдача на каждый затраченный рубль составляет не менее 9–10 рублей. Достаточно заметить, что содержание только одного ребенка с болезнью Дауна обходится государству не менее 150 000 рублей в год, и это при средней продолжительности жизни такого больного около 26 лет!

Естественно, что в целом эффективность ПД определяется частотой, с которой удастся выявить плоды с тяжелыми ВПР, хромосомными и моногенными болезнями. Наиболее эффективна в отношении ВПР у плода УЗ-диагностика, которая в условиях ультразвукового скрининга позволяет выявлять 50–80 % всех ВПР, в том числе практически все ВПР, при которых можно рекомендовать прерывание беременности. Ультразвуковой скрининг особенно эффективен в диагностике ВПР центральной нервной системы, где по данным диагностического (медико-генетического) центра Санкт-Петербурга [197] его эффективность составляет более 90 %, а также множественных ВПР (66 %).

Наибольшие трудности представляет диагностика изолированных пороков сердца (10 %), а также дефектов лицевого черепа и дистальных отделов конечностей (15 %). Важно подчеркнуть, что многие, особенно изолированные, пороки доступны оперативной коррекции. Поэтому до прерывания беременности плодом с ВПР женщине следует настоятельно рекомендовать консультацию врачей хирургов-неонатологов. Однако до принятия решения о постнатальной коррекции любых ВПР необходимо провести ПД с целью исключения хромосомных болезней.

ПД хромосомных или моногенных болезней, которые в подавляющем большинстве пока недоступны лечению, как правило, завершается прерыванием беременности.

Эффективность цитогенетической ПД в значительной мере зависит от показаний к пренатальному кариотипированию, а также от срока беременности.

Результаты цитогенетических исследований (табл. 9.6) показывают, что хромосомный дисбаланс был выявлен в общей сложности у 352 плодов из 8000 (4,4 %). Наибольшая выявляемость плодов с хромосомными аномалиями, то есть эффективность ПД, отмечалась у женщин с УЗ-маркерами у плода (17,6 %), в группе носителей хромосомных перестроек (9,1 %), у женщин возрастной группы (4,0 %). У женщин, ранее родивших детей с хромосомными болезнями или МВПР, частота хромосомной патологии у плода оказалась существенно ниже (2,6 и 2,2 % соответственно). В группе риска, сформированной по результатам биохимического скрининга выявлено 1,7 % плодов с хромосомными болезнями, в основном, с трисомией 21. В целом, полученные нами данные о частоте геномных мутаций у плода в стандартных группах риска полностью соответствуют результатам европейских центров пренатальной диагностики. Однако суммарная частота хромосомного дисбаланса в различных центрах может варьировать в более широких пределах — от 1,5 до 7,3 % (см. табл. 5.4). Основной причиной таких колебаний является соотношение групп риска, сформированных по результатам программ пренатального скрининга. Так, у родителей-носителей хромосомных аномалий (группа № 4, табл. 9.6) практически каждый 10-й плод оказывается носителем несбалансированного кариотипа, как правило, обусловленного родительской хромосомной перестройкой. Частота хромосомных болезней у плода в других группах цитогенетического скрининга (группы № 1–4, табл. 9.6)

составляет в среднем 3,9 %, что в 6 раз превышает популяционную (0,6 %, группа № 7, табл. 9.6). Следует подчеркнуть, что в «возрастной» группе частота хромосомных болезней у плода зависит от соотношения беременных разного возраста — чем многочисленнее окажется группа 35–38-летних, тем ниже будет доля плодов с возраст-зависимой анеуплоидией (см. рис. 6.1, а также раздел 9.4.3). При увеличении группы риска по биохимическому скринингу, где ожидаемая частота трисомии 21 у плода составляет ~ 2 % (см. раздел 9.4.2), общая частота выявляемой патологии будет снижаться, тогда как преобладание группы с УЗМ хромосомных болезней у плода приведет к возрастанию эффективности выявления геномных мутаций. Мы не рассматриваем здесь эффективность выявления хромосомной патологии при сочетании показаний к пренатальному кариотипированию. Отметим только, что в группе сочетанных показаний (возраст ≥ 35 лет, биохимические и ультразвуковые маркеры хромосомных болезней) частота геномных мутаций может достигать 10 % [72].

Как уже отмечалось, общая эффективность ПД варьирует и в зависимости от срока беременности, что объясняется гибелью плодов с хромосомным дисбалансом преимущественно в первой половине беременности. Наиболее наглядно это прослеживается в группе возрастных беременных. Однако частота выявления трисомии 21 практически не зависит от срока беременности (табл. 9.4). Эти данные еще раз подтверждают целесообразность пренатального кариотипирования по возрасту, особенно у беременных 39 лет и старше.

Неожиданно высокой (9,5 %, табл. 5.3 на с. 165) оказалась частота геномных мутаций, выявленных у плодов при проведении ПД после 26-й недели беременности. Учитывая неоднозначное отношение к прерыванию беременности в поздние сроки, проблеме кариотипирования плода в III триместре необходимо уделить особое внимание.

9.11. Пренатальная диагностика в III триместре беременности

Ее главными недостатками и ограничениями являются медицинские и морально-этические проблемы, возникающие перед врачом и самой беременной женщиной. Эти проблемы связаны с решением судьбы жизнеспособного плода с наследственной или врожденной патологией. Что же касается методической части, то любые инвазивные вмеша-

тельства, технически выполнимые во II триместре, вполне применимы и в III триместре беременности. При этом, однако, результативность карiotипирования с использованием прямых препаратов из плаценты и культур клеток амниотической жидкости крайне низка, а проведение кордоцентеза в поздние сроки значительно чаще, чем во II триместре, может спровоцировать преждевременные роды, отслойку плаценты или другие осложнения, требующие экстренного вмешательства акушеров-гинекологов. Поэтому согласно нашему опыту кордоцентез в III триместре беременности необходимо проводить только в условиях стационара.

Другое существенное ограничение заключается в том, что единственной весомой причиной для проведения инвазивного вмешательства с целью ПД в III триместре является необходимость выработки дальнейшей тактики ведения беременности и, главное, способа родоразрешения с учетом состояния матери и диагноза у плода. В этой связи уместно обратить внимание на некоторые клинические аспекты пренатальной диагностики. Так, одним из немногих противопоказаний к инвазивному внутриматочному вмешательству с целью получения плодного материала является угроза прерывания беременности, симптомы которой могут быть проявлением хромосомного дисбаланса у плода [45]. Специальные исследования, проведенные у пациенток с клиническими признаками угрожающего или начавшегося аборта, показали, что частота хромосомных аберраций у плодов при угрозе прерывания беременности существенно выше, чем в контрольной группе, пренатальная диагностика которым была произведена по общепринятым правилам (6,5 и 1,8 % соответственно) [154]. Между тем, как правило, при наличии угрожающего прерывания беременности назначается сохраняющая терапия, при этом оперативные вмешательства по получению плодного материала переносятся на более поздние сроки, что способствует проведению ПД не только хромосомных, но и моногенных болезней в III триместре.

Следует отметить, что ни сроки беременности, ни характер инвазивных манипуляций во II и III триместрах не регламентированы нормативными документами по пренатальной диагностике. При этом, согласно приказу МЗ РФ № 302 от 28.12.93, искусственное прерывание беременности при наличии врожденных пороков развития и наследственных заболеваний возможно на любом сроке. Однако проведение ПД и прерывание беременности по ее результатам в III триместре

нельзя оправдать наличием такого приказа. Их следует рассматривать как безусловный дефект в организации и состоянии всей службы ПД врожденных и наследственных болезней.

Решение вопроса о тактике ведения беременности при наличии нарушений развития плода определяется пренатальным консилиумом, включающим врача-генетика, врача УЗИ, врача акушера-гинеколога, врача-неонатолога и других профильных специалистов. Согласно существующему федеральному законодательству независимо от рекомендаций специалистов окончательное решение о судьбе беременности принимает сама пациентка.

9.12. Современные направления в пренатальной диагностике

Таковыми являются:

- доимплантационная диагностика;
- диагностика по клеткам плода в крови матери.

9.12.1. Доимплантационная диагностика

Доимплантационная диагностика (ДД) появилась в 90-е годы прошлого века благодаря быстрому развитию методов вспомогательной репродукции и микрометодов, приемлемых для анализа генома единичных клеток, таких как методы молекулярной цитогенетики (различные варианты FISH) и молекулярной генетики (варианты ПЦР). В настоящее время список наследственных болезней, доступных для диагностики на доимплантационных стадиях, включает не только многие моногенные (муковисцидоз, фенилкетонурию), но и различные хромосомные болезни. Спектр заболеваний в настоящее время насчитывает более 30 нозологий и включает все наиболее частые моногенные и хромосомные болезни [498]. К 2001 году в мире проведено около 2500 доимплантационных диагностик. После селекции больных и трансплантации в матку здоровых эмбрионов в 500 случаях родились здоровые дети. В России доимплантационная диагностика делает только первые шаги и проводится лишь в нескольких центрах вспомогательных репродуктивных технологий Москвы, Санкт-Петербурга, Красноярска. Причем и в этих центрах она пока ограничена диагностикой пола плода (планирование семьи и X-сцепленные заболевания), а также исключением наиболее частых хромосомных болезней.

Следует напомнить, что материалом для доимплантационной диагностики являются полярные тельца или отдельные бластомеры дробящейся яйцеклетки, полученные микроургическим путем от доимплантационных зародышей — продуктов экстракорпорального оплодотворения (см. главу 4). В зависимости от материала доимплантационную диагностику можно подразделить на преконцепционную (анализ полярных телец) и собственно доимплантационную (анализ бластомеров или клеток трофобласта).

Диагностика с использованием полярных телец позволяет выбирать для оплодотворения ооциты, не несущие генные и геномные мутации. Основная проблема — большая вероятность неточного прогноза о генотипе ооцита при тестировании только первого полярного тельца. Определить наличие мутации можно только после завершения второго деления мейоза, то есть по второму полярному тельцу, которое образуется уже после оплодотворения яйцеклетки.

Вторая проблема обусловлена особенностями применения молекулярно-генетических методов для диагностики единичной клетки. На результаты ПЦР могут повлиять различные факторы, в частности, контаминация образца или условия проведения реакции.

Проблема цитогенетического анализа полярных телец заключается в невозможности применения традиционных методов анализа метафазных хромосом. Поэтому для этих целей обычно используют метод гибридизации *in situ* с мечеными флуорофорами ДНК-зондами, специфичными к участкам отдельных хромосом. В последние годы разработаны и апробированы методы приготовления хромосом из полярных телец человека, пригодных для стандартного цитогенетического анализа. Предложенные модификации уже позволили провести анализ хромосомного набора в полярных тельцах с эффективностью 94,1 % [725, 871].

Таким образом, возможности для преконцепционной диагностики наследственных болезней уже реально существуют, однако, насколько нам известно, в России они пока не применяются. Сложности работы с единичными клетками и большая вероятность диагностических ошибок не оправдывают значительных финансовых затрат на проведение преконцепционной диагностики.

Диагностика на изолированных бластомерах позволяет получить точную информацию о генотипе эмбриона. В основном, биопсия

бластомеров осуществляется на стадии 8–10 клеток. Поскольку на ранних стадиях дробления все бластомеры тотипотентны (т. е. взаимозаменяемы), удаление 1–2 клеток не сказывается на дальнейшем развитии эмбриона. Методически анализ единичных бластомеров от дробящихся зародышей принципиально не отличается от анализа полярных телец.

Выбор метода молекулярной диагностики определяется спецификой исследуемой мутации и включает как метод ПЦР, так и более сложные ДНК-методы. Они позволяют проводить диагностику наиболее распространенных моногенных болезней — аутосомно-рецессивных (муковисцидоз, β -талассемия, спинальная амиотрофия Верднига–Гоффмана, болезнь Тея–Сакса), аутосомно-доминантных (миотоническая дистрофия, синдром Марфана, хорея Гентингтона), X-сцепленных (миодистрофия Дюшенна и синдром ломкой X-хромосомы), а также некоторых более редких болезней.

Цитогенетическая доимплантационная диагностика проводится на 1–2 бластомерах методом FISH с использованием ДНК-зондов, специфичных к прицентромерным или теломерным районам хромосом 16, 18, 21, 13, X, Y. При гетерозиготном носительстве транслокации одним из родителей для диагностики методом FISH используются цельнохромосомные и локус-специфичные ДНК-зонды.

Проблема диагностики численных аномалий кариотипа осложняется высокой частотой хромосомного мозаицизма на ранних стадиях эмбриогенеза человека. Доимплантационная диагностика на этой стадии может быть рекомендована только в группах высокого риска рождения ребенка с наследственной патологией.

Более надежная доимплантационная диагностика может быть проведена на стадии бластоцисты. На этой стадии зародыш состоит примерно из 60–100 клеток. При визуализации трофобласта и эмбриобласта без ущерба для развития эмбриона можно удалить до 10 клеток трофобласта. Следует, однако, учитывать, что культивирование эмбрионов *in vitro* в программах ЭКО крайне редко доводят до стадии бластоцисты, т. к. способность к имплантации таких эмбрионов может оказаться существенно сниженной.

Удивительные возможности доимплантационной диагностики в сочетании с другими методами вспомогательных репродуктивных технологий наглядно продемонстрированы в исследованиях, прове-

денных в Институте генетики репродукции человека в Чикаго (США) [724]. Цель работы заключалась в попытке лечения 5-летней девочки, страдающей анемией Фанкони, обычно приводящей к смерти вследствие аплазии костного мозга.

Для этого от матери больного ребенка путем искусственной гормональной стимуляции с последующим оплодотворением *in vitro* сперматозоидами мужа были получены более 30 зародышей. С помощью молекулярных методов вначале была проведена селекция зародышей, лишенных мутации гена анемии Фанкони. На втором этапе путем тестирования генов локуса HLA были отобраны здоровые зародыши, гистосовместимые с клетками больной девочки. После трансплантации в матку матери удалось выносить и родить здорового мальчика, пуповинная кровь которого, полученная при рождении, была использована в качестве донорской для больной девочки. Благодаря содержащимся в пуповинной крови стволовым кроветворным клеткам девочка была спасена. В настоящее время брат и сестра соматически вполне здоровы. Естественно, что такое исцеление стало возможным благодаря серьезным успехам не только в доимплантационной диагностике, но и в других современных технологиях, включая клеточную терапию с использованием стволовых клеток.

Таким образом, основное (и зачастую, единственное) преимущество диагностики до имплантации заключается в возможности трансплантации генетически полноценных эмбрионов. Недостатками этого подхода являются методические трудности, связанные с необходимостью работы с микроколичествами материала, ограничения диагностики рамками программ ЭКО и большая вероятность ошибочной диагностики.

Доимплантационная диагностика в России пока не имеет широкого распространения. Она проводится только в нескольких ведущих центрах ЭКО, весьма дорогостоящая, требует специально подготовленных специалистов, оборудования и реактивов, чревата повышенной частотой ошибок. После диагностики до имплантации и наступления беременности нередко возникает необходимость проведения стандартной ПД на постимплантационных стадиях.

Более детально с методами, возможностями и ограничениями ПД в доимплантационный период можно ознакомиться в соответствующих руководствах и монографиях [384, 871, 873].

9.12.2. Неинвазивные методы пренатальной диагностики

Любое хирургическое вмешательство при заборе плодного материала неизбежно сопряжено с риском осложнений. Так, удаление бластомеров при доимплантационной диагностике может вызвать замедление темпов дробления и остановку развития эмбриона на ранних стадиях. После имплантации инвазивное вмешательство с целью получения ворсинок хориона или плаценты, околоплодных вод или крови из пуповины может привести к гибели плода и спонтанному прерыванию беременности. Поэтому разработка неинвазивных методов пренатальной диагностики, позволяющих избежать любых осложнений, представляется вполне оправданной.

Поиски методов получения плодного материала, исключающие хирургическое вмешательство, велись в двух направлениях. Одно из них включало изучение возможностей использования клеток плода из влагалища и цервикального канала матки; второе — клеток плода, циркулирующих в крови беременной женщины. Кратко рассмотрим основные достижения и недостатки этих подходов для диагностики хромосомных болезней.

9.12.2.1. Клетки плода в трансцервикальных образцах

Еще в 1893 году было показано, что клетки трофобласта зародыша человека могут мигрировать из плаценты в маточную вену и достигать легких. Столетие спустя они были обнаружены и в цервикальном канале матки [213]. Механизмы проникновения клеток трофобласта в цервикальный канал до сих пор не изучены, однако наличие клеток трофобласта в образцах цервикальной слизи было доказано различными методами.

Для получения трансцервикальных образцов на сроках беременности 6–15 недель предложено несколько способов — соскобы и смывы со стенок канала, аспирация цервикальной слизи [213]. В зависимости от способа получения образцы в большей или меньшей мере загрязнены клетками материнских тканей, при этом эмбриональные клетки, представленные клеточными элементами плацентарных тканей, составляют около 30–50% клеточного состава [273].

Для исследования полученного образца используется комплексный подход, который включает ПЦР для анализа высокополиморфных КТП и FISH с прицентромерными пробами на нативных клетках и после кратковременного культивирования, которое позволяет также провести кариотипирование [213].

Использование трансцервикальных образцов не нашло широкого применения в клинической практике. В основном это обусловлено методическими трудностями работы с заведомо контаминированными образцами, что резко снижает диагностическую ценность этого подхода. Несмотря на то, что некоторыми исследователями продемонстрирована высокая эффективность получения материала и его анализа для определения пола плода и распространенных анеуплоидий [213], другие авторы получили результат лишь в 44 % случаев [677]. Кроме того, до сих пор не определен риск осложнений после получения плодного материала, так как все исследования были проведены непосредственно перед абортom. Редкие случаи, где этот анализ был дополнен традиционными методами пренатальной диагностики [677], не дают оснований определить риск прерывания беременности, что имеет принципиальное значение для внедрения метода в медицинскую практику.

9.12.2.2. Клетки и ДНК плода в крови матери

В последние годы предприняты усилия по разработке методов пренатальной диагностики с использованием клеток плода, выделенных из крови матери. Количество клеток плода, циркулирующих в крови беременной, оценивается как крайне незначительное — в среднем 1×10^4 – 10^6 . Однако до сих пор остается дискуссионным вопрос о динамике их количества на разных сроках беременности, а также сохранности в организме матери после родоразрешения или прерывания беременности.

Состав клеток плода в кровяном русле матери варьирует и представлен как элементами собственно крови плода, в том числе ядерными эритроцитами, так и клеточными элементами плаценты [23, 66, 384].

Предварительным этапом анализа является фракционирование крови беременной. Клеточная сортировка осуществляется с помощью методов проточной цитофлуориметрии, магнитной активации или проточного центрифугирования. Все методы, применяемые для этих целей, позволяют обогатить образец клетками плодного происхождения. Предприняты успешные попытки получения воспроизводимых в стандартных лабораторных условиях результатов с использованием ступенчатого центрифугирования в градиенте плотности фиколла [66], либо путем отбора таких клеток на предметных стеклах при помощи иглы микроманипулятора после предварительной окраски обогащенной суспензии для выявления фетального гемоглобина.

Для анализа плодных клеток, выделенных из кровяного русла матери, как правило, применяются высокотехнологичные методы молекулярной генетики и цитогенетики. На них уже продемонстрированы возможности диагностики пола плода и распространенных анеуплоидий [23, 66, 678].

Исследование клеток плода в крови матери на практике может быть использовано не столько для диагностических целей, сколько с целью формирования групп высокого риска рождения больного ребенка. Однако их широкое применение в режиме скрининга недоступно для широкой клинической практики по причине высокой стоимости. В то же время, методы, основанные на анализе плодного материала, представленного в крови матери, в некоторых случаях могут оказаться единственно возможным методом диагностики, например, при состояниях угрожающего выкидыша.

Интересным и многообещающим кажется предложенный недавно подход, основанный на анализе внеклеточной ДНК плода в крови матери [577]. Предполагают, что ДНК вследствие деградации клеток плода попадает в плазму материнской крови, где может быть обнаружена при помощи ПЦР. В настоящее время поступили сообщения уже из нескольких лабораторий мира об успешной диагностике по ДНК плода в крови матери резус-принадлежности и пола плода [478, 728].

Очевидно, что диагностика по клеткам плода в крови матери, равно как и доимплантационная диагностика, не могут быть альтернативой ПД с использованием стандартных инвазивных методов в установленные сроки беременности. Именно благодаря высокой точности и минимальной опасности для матери и плода инвазивные методы пренатальной диагностики завоевали столь широкую популярность во всем мире. Совершенствование этих стандартных подходов в сочетании с повышением разрешающей способности молекулярных и цитогенетических методов исследования можно рассматривать как реальную перспективу развития пренатальной диагностики XXI века.

9.12.3. Комбинированный пренатальный скрининг хромосомных болезней в I триместре

В последнее время появляется все больше сообщений об эффективности ПД в I триместре беременности в наиболее удобные для хорионбиопсии сроки с 10-й по 12-ю недели беременности (см.

раздел 9.4.2). Диагностика основана на большой дискриминационной силе двух маркерных сывороточных белков: свободной β -субъединицы хорионического гонадотропина и белка А, ассоциированного с беременностью (РАРР-А), и одновременной детекции двух новых УЗ-маркеров: толщины воротникового пространства и визуализации назальных костей. Такое тестирование позволяет с высокой эффективностью (до 85 %) формировать группы высокого риска по рождению детей с хромосомной патологией (болезнь Дауна). Анализ обширного клинического материала свидетельствует о том, что увеличение толщины воротникового пространства (ТВП) у плода более 2,5 мм, выявляемое при ультразвуковом скрининге на 11–14-й неделе беременности является серьезным маркером хромосомных болезней (выявляемость более 30 %) и аномалий сердца (почти 90 %).

Первая публикация об отсутствии носовых костей (НК) как УЗ-маркере болезни Дауна появилась в 2001 г. [211] и сразу привлекла к себе пристальное внимание специалистов. При проспективном исследовании установлено отсутствие НК у 73 % плодов с болезнью Дауна (43 из 59). Дальнейшие исследования показали, что сочетание биохимического (free β -НСГ + РАРР-А) и ультразвукового скрининга (ТВП + НК) позволяет выявлять до 97,5 % плодов с хромосомными аномалиями, особенно с болезнью Дауна, при сравнительно низком (до 1,5 %) числе ложноположительных результатов. Рассмотренный вариант комбинированного биохимического и ультразвукового скрининга в I триместре беременности оказывается более эффективным, чем во II. Естественно, что ПД в первом триместре значительно предпочтительней, чем во втором, и для самой женщины.

Дальнейшим шагом в совершенствовании ПД в I триместре явилась разработка методов биохимического и ультразвукового скрининга с использованием новых высокоэффективных автоматических программ расчета комбинированного риска, применение которых сокращает время выдачи ответов до 1–2 часов. Это позволило в ряде стран Западной Европы (Великобритания) организовать специальные клиники разовых посещений для оценки риска хромосомных болезней (болезни Дауна) у плода: OSCAR (One Step Clinic for Assessment of Risk). С учетом их высокой пропускной способности и эффективности, несомненных удобств для беременных, организация подобных клиник в России явилась бы важным государственным шагом на пути профилактики хромосомных болезней.

9.12.4. Молекулярная диагностика хромосомных болезней

Кариотипирование плода на любом сроке беременности представляет собой длительный, кропотливый труд врачей-цитогенетиков, который нередко является основным фактором, лимитирующим объем и эффективность работы центров ПД.

В последние годы разработана и уже широко применяется за рубежом молекулярная диагностика наиболее частых анеуплоидий, таких как трисомия 21 (синдром Дауна), трисомия 13 (синдром Патау), трисомия 18 (синдром Эдвардса), моносомия X (синдром Шерешевского–Тернера), другие нарушения числа гоносом. На долю этих хромосом приходится почти 99 % нарушений кариотипа, совместимых с живорождением и приводящих к хромосомным болезням в постнатальном периоде. Метод получил название флуоресцентной количественной ПЦР (Quantitative Fluorescent PCR — QF-PCR). Принцип метода заключается в одновременной амплификации полиморфных по длине небольших фрагментов ДНК, расположенных на каждой из вышеперечисленных хромосом. При этом благодаря использованию в реакции ПЦР специальных флуорохромов каждый из продуктов амплификации легко дискриминируется после разделения на электрофорезе, а применение специального сканера для считывания гелей позволяет точно определить дозу амплифицированной ДНК каждого фрагмента отдельной хромосомы. Наличие тройной дозы (трех копий) какого-нибудь фрагмента доказывает трисомию соответствующей хромосомы, двойной дозы — нормальный диплоидный набор, а одинарной — моносомию. Результаты детекции количественных хромосомных aberrаций с помощью молекулярных методов приведены на рисунке 9.11. Быстрота анализа (в среднем, 24–27 часов), эффективность 98 %, практическое отсутствие ложноположительных или ложноотрицательных результатов, огромная пропускная способность (одновременное сканирование 300–3000 образцов) открывают большие диагностические перспективы перед этим методом, уже получившим второе название — тест быстрого скрининга анеуплоидии (ТБСА).

Важно подчеркнуть, что этот тест отнюдь не подменяет традиционного кариотипирования, но позволяет оперативно выявить плоды с хромосомной патологией, в том числе и с хромосомным мозаицизмом, кариотип которых будет в дальнейшем детально проанализирован.

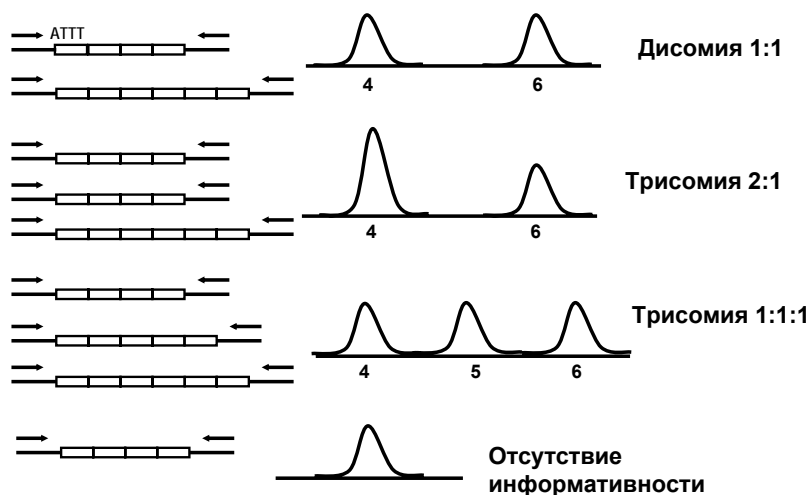


Рис. 9.11. Метод количественной ПЦР (QF-PCR)

Таким образом, ТБСА следует рассматривать как важное подспорье для кариотипирования, как новый эффективный скринирующий тест, который может быть с успехом применен для анализа образцов амниотической жидкости или хориона/плаценты у женщин групп высокого риска, сформированных по результатам биохимического и ультразвукового скрининга.

Серьезным недостатком ТБСА является достаточно высокая стоимость приборного обеспечения и реагентов для проведения QF-PCR.

9.12.5. Генная и клеточная терапия плода

По мере выяснения контролирующих механизмов раннего эмбриогенеза человека все более реальной становится клеточная и генная терапия плода. Более того, несмотря на существующие ограничения в этой области в отношении человека, в этом направлении уже достигнуты вполне реальные успехи. В частности, путем заменного переливания пуповинной крови плода во II–III триместрах беременности в нашем институте уже удастся спасти ребенка от гемолитической болезни, развивающейся вследствие Rh-конфликта между матерью и плодом [112]. Не менее удивительными представляются

и результаты лечения бесплодия у женщин путем инъекции в овулировавшие, но неполноценные яйцеклетки микрообъемов ооплазмы с находящимися в них митохондриями из ооцитов, полученных от здоровой женщины с нормальной репродуктивной функцией [639].

На уровне экспериментов пока остается коррекция многих наследственных дефектов обмена, болезней печени, кроветворения и системы свертывания крови путем введения через пуповинную вену взвеси здоровых клеток печени от медицинского абортуса [284, 430, 853]. Реально предполагать, что создание таких искусственных химер может предотвратить развитие основного заболевания. Как при этом будет развиваться иммунологический статус плода? Каковы иммунологические взаимоотношения между клетками донора и реципиента в зависимости от срока беременности, на котором проводилась трансплантация? Может ли и каким образом проявиться реакция HLA несовместимости донора и реципиента? Как долго остаются жизнеспособными и сохраняются ли в постнатальном периоде трансплантированные клетки? Все эти вопросы пока активно изучаются в экспериментах на крупных млекопитающих. Некоторые из таких исследований близки к клиническим испытаниям. Ярким примером успешного применения методов клеточной терапии в клинической практике является рассмотренный нами случай лечения моногенной наследственной болезни — анемии Фанкони с помощью стволовых клеток пуповинной крови (см. раздел 9.12.1).

В настоящее время, однако, накоплено мало информации о судьбе чужеродных генов в организме плода. Между тем, установлено, что эффективность генной терапии существенно выше при введении чужеродных генных конструкций в активно пролиферирующие ткани. Считается поэтому, что коррекция многих генетических дефектов должна начинаться еще внутриутробно, задолго до клинических проявлений заболевания [10].

Огромные горизонты перед наукой и практикой открывают исследования стволовых клеток из доимплантационных зародышей человека и из пуповинной крови. Во многих странах уже созданы банки пуповинной крови для лечения острых лейкозов и других заболеваний у детей. Активно обсуждается и уже внедряется в практику идея создания индивидуальных банков стволовых клеток (ИБСК) пуповинной крови для каждого новорожденного. Такой ИБСК

может иметь огромное значение при лечении различных заболеваний в постнатальном периоде как у самого ребенка, так и у его близких родственников. Такие банки с емкостью в несколько тысяч образцов уже созданы в различных странах Западной Европы и Америки. Создание таких банков на коммерческой основе уже предпринимается и в России.

Таким образом, дальнейшее совершенствование генетической карты репродуктивного здоровья (**ГКРЗ**), поиск и анализ мутаций в регуляторных генах, клеточная и генная терапия плода представляют собой передний край ПД.

Заключение

Положения современной ПД можно суммировать в следующих основных выводах.

При планировании семьи супружеской паре показано проспективное медико-генетическое консультирование с целью первичной оценки риска ВПР и наследственных болезней, для предоставления информации о преконцепционной профилактике. По желанию супругов возможно генетическое тестирование с целью формирования генетической карты репродуктивного здоровья (ГКРЗ).

Важны: ранняя постановка беременной на учет в женской консультации, УЗ-обследование на 10–11-й неделях для регистрации точного срока беременности, направление женщины на инвазивную ПД в I триместре при наличии абсолютных показаний: возраст 39 лет и старше, наличие хромосомных перестроек у одного из супругов, МВПР или хромосомные болезни у предыдущего ребенка, по результатам ультразвукового скрининга, проведение комбинированного ультразвукового (ТВП + НК) и биохимического (β -ХГЧ + РАРР-А) скринингов, дополненных при необходимости кариотипированием плода после инвазивной ПД, высокий риск моногенных болезней.

Во II триместре ПД включает скринирование маркерных сывороточных белков (АФП и ХГЧ) на 15–18-й неделях беременности, оценку риска болезни Дауна (табличные данные или компьютерная программа), направление женщин с риском более 0,5 % на инвазивную ПД с целью получения биоптатов плаценты или амниоцитов (до 20-й недели беременности), лимфоцитов пуповинной крови плода (после 20-й недели беременности) для пренатального кариотипирования,

ультразвуковой скрининг на 18–22-й неделях беременности для выявления врожденных пороков развития.

В России диагностируется более 40 различных моногенных болезней (табл. 9.8), 10 наиболее распространенных из них диагностируются пренатально в НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН.

Инвазивная ПД в III триместре беременности проводится в условиях стационара для выработки тактики ведения беременности и родов; решение об инвазивной ПД на поздних сроках беременности принимается консилиумом (акушер-гинеколог, педиатр, генетик, специалист УЗИ).

Наиболее перспективными направлениями в развитии ПД являются комбинированный скрининг МСБ (β -ХГЧ + РАРР-А) и ультразвуковой скрининг (ТВП + НК) в I триместре беременности, перспективным для ПД в России представляется создание однодневных центров оценки риска болезни Дауна у плода, внедрение эффективного и высокопроизводительного метода молекулярной диагностики хромосомных болезней (QF-PCR).

ГЛАВА 10 ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОСОМ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Введение

Комплексный анализ особенностей эмбриогенеза в условиях хромосомных aberrаций — один из важных подходов к изучению роли индивидуальных хромосом в развитии человека. Естественно, что прижизненное исследование зародышей с помощью УЗ-аппаратов, дополненное детальным патоморфологическим анализом аутопсийного материала, безусловно, расширяет наши представления о роли дисбаланса различных хромосом в патологии эмбриогенеза по сравнению с более ранними наблюдениями, выполненными только на материале спонтанных аборт. Вместе с тем, учитывая особенности структурно-функциональной организации каждой хромосомы, сложность и уникальность ее генного состава, включающего не только структурные гены, но и регуляторные последовательности, в том числе и факторы транскрипции, контролирующие функции не только генов своей хромосомы, но и генных ансамблей других хромосом, остается актуальным использование других, более тонких подходов к анализу функции целых хромосом и их отдельных сегментов. Для этих целей применяются специальные методы, позволяющие визуализировать непосредственно на цитологических препаратах активно работающие гены, точнее кластеры генов, сосредоточенные в определенных участках хромосом. К ним относятся метод избирательной окраски работающих рибосомных генов, методы рестрикции *in situ*, методы ник-трансляции *in situ* и другие молекулярные методы, ранее применявшиеся только в экспериментах с изолированной ДНК. Доступность материала позволяет уже сегодня проводить исследования

на любой стадии эмбриогенеза человека с целью изучения особенностей репликации хромосом, паттернов их метилирования, состояния гетерохроматина, функции ядрышкообразующих районов и др. В данной главе суммированы некоторые результаты исследований особенностей структурно-функциональной организации хромосом у эмбрионов и плодов человека.

10.1. Особенности структурной организации ядрышкообразующих районов хромосом человека

Почти половина общей транскрипционной активности клетки приходится на долю генов, кодирующих рРНК. У человека кластеры рибосомных генов располагаются в спутничных нитях пяти пар акроцентрических хромосом (13, 14, 15, 21 и 22) в областях ЯОР. Гены рРНК в них построены в виде длинных повторов по типу «голова к хвосту». Каждая единица транскрипции рРНК в таком повторе кодирует 18S, 5,8S и 28S рРНК, перечисленные в порядке их расположения, начиная с 5'-конца. Участки, кодирующие единицы рРНК, высококонсервативны, тогда как по промежуточным (спейсерным) участкам наблюдается значительная межвидовая и внутривидовая изменчивость в разных группах эукариот [866].

Транскрипция рДНК является сложным многоэтапным процессом, происходящим в интерфазном ядрышке начиная с поздней телофазы и вплоть до следующего митоза. Одна молекула РНК-полимеразы I считывает сразу три гена, соответствующих трем типам кодируемых РНК, а также оба внутренних спейсера, синтезируя 45S про-рРНК. Во время транскрипции 45S про-рРНК остается связанной с соответствующими рибосомными белками, предотвращающими ее деградацию. В ходе последующего процессинга она расщепляется на 18S, 5,8S и 28S субъединицы рРНК, которые транспортируются в цитоплазму, а спейсеры разрушаются ядерными нуклеазами [174].

В процесс транскрипции *p*-генов вовлечены не только основные ферменты транскрипционного комплекса, но и комплекс кислых белков, обладающих повышенным сродством к ионам серебра и получивших название Ag-ЯОР белков [169]. Предполагается, что основными факторами, влияющими на качественный и количественный состав аргентофильных ядрышковых белков, являются пролиферативный статус клетки и стадия клеточного цикла [222].

Основные аргентофильные компоненты интерфазного ядрышка представлены белком C23, или нуклеолином (105кДа), а также белком B23, или нумотрином (39кДа) [769]. При переходе из фазы S в фазу G2 общее количество этих белков значительно возрастает [222]. Эти свойства Ag-ЯОР белков используются в клинической практике для оценки пролиферативного статуса клеток и определения процентного соотношения клеток на разных стадиях клеточного цикла в малигнизированных тканях [104].

Во время митоза, когда транскрипция рибосомных генов приостанавливается, связанные с ЯОР остаются менее 5% белков, таких как РНК-полимераза I, фактор UBF и многокомпонентный фактор SL I [846].

Разработанный в середине 1970-х годов метод селективной окраски нитратом серебра кислых белков в районах ядрышковых организаторов [480] доказывает наличие выраженного функционального полиморфизма хромосом человека по рибосомным генам. В сочетании с методом гибридизации *in situ* с мечеными ДНК-зондами, позволяющими оценить размеры кластеров *p*-генов, этот метод дает реальные возможности для изучения транскрипционной активности *p*-генов непосредственно на препаратах метафазных хромосом [463].

10.1.1. Полиморфизм ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом

Для характеристики функционального состояния ЯОР метафазных хромосом предложена полуколичественная система визуальной оценки размеров гранул серебра, отражающая степень активности кластера *p*-генов в условных единицах — 4-балльная [107] (рис. 10.1) и 5-балльная [117]. Аналогичная система применяется и для визуальной оценки числа копий *p*-генов по размерам гибридизационного сигнала в районах ядрышковых организаторов после проведения гибридизации *in situ* (FISH) с использованием рДНК-зонда [3] (рис. 10.2).

К настоящему времени твердо установлена выраженная вариабельность (полиморфизм) числа аргентофильных ЯОР на клетку, различная интенсивность их окраски в разных ЯО-хромосомах и в разных клетках одного организма, а также межиндивидуальный полиморфизм по всем этим признакам.



Рис.10.1. Четырехбалльная система оценки размеров гранул серебра на индивидуальных ЯОР. Цифрами отмечены соответствующие баллы

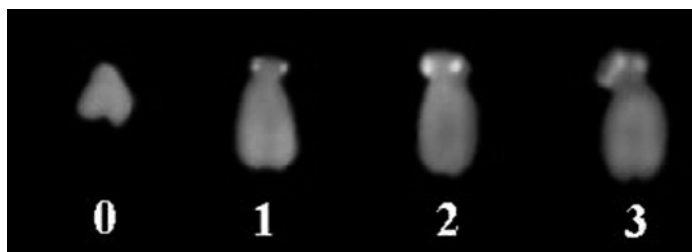


Рис.10.2. Четырехбалльная система оценки интенсивности гибридационного сигнала на индивидуальных ЯОР. Цифрами отмечены соответствующие баллы

Общее число копий рибосомных генов в геноме человека составляет около 400, соответственно в каждом из десяти ЯОР хромосом содержится около 40 tandemно повторяющихся кластеров *p*-генов. Эти кластеры распределены по ЯО-хромосомам весьма неравномерно. Более того, уровень экспрессии отдельных ЯОР может не соответствовать количеству содержащихся в них копий *p*-генов [107, 505]. Эти различия в структурной организации и функциональной активности и определяют межхромосомный полиморфизм ЯОР.

Рисунок окрашивания каждого ЯОР генетически детерминирован и наследуется как простой менделевский признак, однако отмечаются и исключения. Так, в разных клетках характер серебрения одного-двух ЯОР, при относительной стабильности окраски остальных ядрышковых организаторов, обычно неодинаков. Это приводит к появлению внутрииндивидуального межклеточного полиморфизма [180]. Согласно исследованиям в постнатальном периоде онтогенеза человека рисунок ЯОР может меняться в зависимости от типа клеток [375, 696], вида ткани [505, 629], а также возраста [39, 571]. Транскрипционная активность отдельных ЯОР варьирует также у детей и их родителей [505, 830].

Наконец, наблюдаются межиндивидуальные различия как по числу хромосом с функционально активными ЯОР в кариотипе, так и по их суммарной активности. Основной причиной межиндивидуального полиморфизма является случайная комбинаторика 5 пар акроцентрических хромосом, несущих разное количество копий генов рРНК [101]. Пределы варьирования суммарной активности ЯОР достаточно широки, однако не выходят за рамки определенных пороговых значений, за пределами которых дисбаланс генов, локализованных в ЯОР, может быть причиной различных фенотипических нарушений [107].

10.1.2. Механизмы регуляции функциональной активности рибосомных генов

Функциональный полиморфизм ЯОР может быть обусловлен как числом транскрибируемых копий *p*-генов, так и колебаниями их транскрипционной активности.

К изменению числа копий *p*-генов в кластере (делении части копий либо их тандемной дупликацией) приводит неравный кроссинговер, который может происходить как между гомологичными ядрышкообразующими хромосомами, так и вследствие негомологичной рекомбинации в мейозе [636].

Вместе с тем, при наследовании число копий генов рРНК в каждой ЯО-хромосоме, как правило, остается неизменным. Сохранение в большинстве случаев определенного уровня активности индивидуальных ЯОР, возможно, обеспечивается равным распределением между дочерними хромосомами рДНК-транскрипционного комплекса, который и определяет тип экспрессии соответствующих кластеров ЯО-генов [846].

Нередко транскрипционная активность некоторых ЯОР при передаче потомству меняется. Эта изменчивость позволяет предположить возможность наследования не жестко закрепленного признака, а некоторого диапазона потенциальной изменчивости в функционировании ЯОР индивидуальных акроцентрических хромосом [180]. Не исключено, что реализация этих потенциалов осуществляется с помощью присутствующих в геноме так называемых «молчащих» рибосомных генов [103]. Возможно, эти резервные гены рРНК могут в определенных условиях реактивироваться, однако природа «молчащих» *p*-генов и факторов, влияющих на их работу, остаются до сих пор невыясненными.

В какой-то мере вариабельность функционирования структурно идентичных кластеров рибосомных генов объясняет двухступенчатая модель активации ЯОР [908]. Она предполагает вероятностное связывание транскрипционных факторов с разными ЯОР в клетке. На первом этапе определенное количество транскрипционных факторов случайным образом связывается с *p*-генными кластерами, так что любой ЯОР равновероятно может присоединить требуемые факторы транскрипции. В том случае, если в клетке присутствуют гетероморфные ЯОР, наибольший по размерам ЯОР наиболее вероятно будет связывать большее количество факторов и, следовательно, иметь большую транскрипционную активность. На втором этапе происходит кооперативное связывание оставшихся факторов транскрипции, имеющих большее сродство к промоторам тех копий *p*-генов, которые на первом этапе уже связали ферменты транскрипционного комплекса. В основе этого процесса могут лежать такие механизмы как локальная перестройка хроматина в ЯОР или «усиливающее» действие определенных транскрипционных агентов, локализованных в спейсерных участках рДНК. Кооперативное связывание приводит к активации тех ЯОР, которые присоединили факторы транскрипции на первом этапе. Оставшиеся ЯОР будут активироваться только в том случае, если первично активированных копий *p*-генов недостаточно для нормальной жизнедеятельности клетки. Таким образом, двухступенчатая модель активации ЯОР предполагает существование определенной «иерархии» активации ЯОР, при которой больший по размеру *p*-генный кластер будет проявлять соответственно большую транскрипционную активность.

Принимая во внимание, что копияность кластеров *p*-генов и уровень их активности не всегда коррелируют друг с другом, следует допустить существование механизмов регуляции уровня экспрессии. Предполагается, что основную роль могут играть метилирование рДНК, ацетилирование гистонов, изменение структуры хроматина, а также инактивация *p*-генов, обусловленная эффектом положения [450].

Одним из основных доказательств ключевой роли метилирования в регуляции активности рибосомных генов являются опыты с использованием аналога цитозина — 5-азациитидина, который вызывает деметилирование ДНК. При введении этого агента в культуру клеток в период репликации ДНК происходит деспирализация и реактивация ранее «молчащих» *p*-генов [22, 505, 591].

Для инактивации рибосомных генов необходимо метилирование определенных положений в гене рРНК. Так, в экспериментах на мышах было установлено, что для репрессии *p*-генов достаточно метилирования единственного CpG динуклеотида в регуляторной области, которое затрудняет связывание активатора транскрипции рДНК фактора UBF и тем самым предотвращает и формирование транскрипционного комплекса. Этот эффект усиливается, если метилированным оказывается энхансер, расположенный перед промоторной областью *p*-гена [775]. Для инактивации транскрипции гена рРНК человека необходимо метилирование положений -96, -102 и -347 в ДНК промоторной области [768].

На следующем этапе инактивации рДНК с ней связывается NoRC (Nucleolar Remodelling Complex) — особый белковый комплекс ремоделирования хроматина [750]. Он вызывает гетерохроматинизацию за счет метилирования рДНК и деацетилирования гистонов. Ассоциация с кластерами рДНК транскрипционного комплекса на всем протяжении клеточного цикла, его сохранность в митозе, когда экспрессия подавлена, свидетельствуют о том, что репрессия транскрипции *p*-генов обратима [439]. При этом метилирование является своеобразным механизмом клеточной памяти. После репликации на вновь синтезированных нитях ДНК метилированные цитозины ранее инактивированных рибосомных генов являются маркерами для белков-репрессоров [813], изменяющих нуклеосомную структуру хроматина в кластере *p*-генов [321, 584].

Предполагается также, что дополнительным фактором, влияющим на функциональную активность ЯОР, является присутствие блоков конститутивного гетерохроматина (С-блоков) в участках, смежных с *p*-генными кластерами [450]. Ярко выраженный эффект положения отмечен у шимпанзе, у которых ЯОР часто фланкированы блоками конститутивного гетерохроматина, и именно поэтому рДНК оказывается подверженной репрессии в участках, прилежащих к С-блокам. Для человека подобный эффект положения ЯОР характерен в меньшей степени, возможно, потому, что С-блоки в прицентромерном районе обычно присутствуют только с одной стороны от кластера *p*-генов, которые оказываются «зажатými» между участками конститутивного гетерохроматина.

Таким образом, функциональная активность ЯОР и число содержащихся в них копий генов рРНК взаимосвязаны, при этом активность

ЯОР определяется числом работающих копий *p*-генов, экспрессия которых, в свою очередь, регулируется на уровне транскрипции. До настоящего времени, однако, до конца не выяснены факторы, которые вызывают изменение транскрипционной активности *p*-генов.

10.1.3. Характеристика функционального состояния ЯОР в эмбриогенезе человека

Изучение функциональной активности *p*-генов в эмбриогенезе, безусловно, заслуживает пристального внимания, поскольку нарушения в системе ЯОР могут быть причиной различных аномалий или даже гибели плода [101, 102].

Функционирование рибосомных генов в ходе эмбриогенеза детально исследовано на примере лабораторных млекопитающих, в частности, мыши [171, 847], крысы [698] и американской норки [73].

У мышей аргентофильные белки определяются в мужском и в женском пронуклеусах. После оплодотворения они выявляются в комплексе с деконденсирующимся хроматином сперматозоида и материнскими телофазными хромосомами. Впоследствии аргентофильные белки ЯОР транспортируются из пронуклеусов в проядрышки, а во время первого деления митоза переносятся в цитоплазму. На стадии зиготы эти белки не участвуют в транскрипции рибосомных генов, но, вероятно, играют определенную роль в функционировании других генов и в регуляции клеточного цикла. Таким образом, в первом делении дробления аргентофильные ЯОР не выявляются на метафазных хромосомах. Однако, уже начиная со стадии 2-клеточного зародыша, метафазные хромосомы содержат Ag-ЯОР. В ходе эмбрионального развития мышей и крыс [58], а также американской норки [73] число аргентофильных ядрышковых организаторов на клетку может изменяться.

Экспериментальные данные по изучению динамики ЯОР на разных стадиях эмбриогенеза позволяют предполагать, что дифференциальная активность каждого ЯОР определяется своеобразной наследственной программой. Регуляция этого процесса осуществляется как путем активации/инактивации целых кластеров рибосомных генов [58], так и путем изменения скорости транскрипции в каждом из них [73].

Сведения о функционировании ЯОР в эмбриогенезе человека многочисленны.

Так, при анализе лимфоидных клеток у эмбрионов 5–10 недель развития установлено, что характер Ag-окраски ЯОР не отличается от такового в ФГА-стимулированных лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов [180]. Данные о влиянии каких-либо факторов на экспрессию *p*-генов в эмбриогенезе человека до 16-й недели развития получены при анализе фибробластов различного происхождения [117, 122, 180]. Установлено, что среднее число аргентофильных ЯОР на клетку в разных тканях зародыша человека варьирует ($8,71 \pm 0,10$ у медицинских, $8,99 \pm 0,08$ у спонтанных абортусов), а их суммарная активность находится в пределах 15,6–28,4 баллов. Увеличение числа аргентофильных хромосом и повышение суммарной активности ЯОР на клетку у спонтанных по сравнению с медицинскими абортусами отмечалось преимущественно за счет плодов женского пола. Несмотря на наличие корреляции между активностью ЯОР и сроком беременности, статистически значимых изменений в функционировании ЯОР в ходе эмбрионального развития не выявлено [117].

Таким образом, информация о функциональном полиморфизме ЯОР в эмбриогенезе человека пока весьма ограничена. Остались невыясненными структурно-функциональные особенности ЯОР хромосом человека в клетках эмбриональных и экстраэмбриональных тканей *in vivo*, закономерности наследования и изменчивости уровня экспрессии индивидуальных ЯОР и их вклад в общую вариабельность *p*-генов, а также факторы, влияющие на эти процессы. Для восполнения этих пробелов нами были предприняты исследования полиморфизма ЯОР метафазных хромосом в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях плода человека на разных стадиях развития, а также в лимфоцитах пуповинной крови. Ниже суммированы результаты этих исследований.

10.1.3.1. Полиморфизм ЯОР у эмбрионов 6,5–14 недель развития

При исследовании ЯОР на «прямых» препаратах метафазных хромосом из клеток экстраэмбриональных (цитотрофобласт) и эмбриональных тканей (мозг, кишечный эпителий, легкое, печень, почка, роговица глаза) медицинских абортусов с нормальным кариотипом оказалось, что среднее число Ag⁺-ЯОР хромосом на метафазную пластинку варьирует от $6,1 \pm 0,46$ до $8,3 \pm 0,68$ [146].

Средняя суммарная активность ЯОР хромосом групп D и G, отражающая интенсивность экспрессии локализованных в них *p*-генов, варьировала в широких пределах — от $17,8 \pm 1,64$ до $34,2 \pm 2,18$ баллов [146]. При этом 42% общей вариабельности активности *p*-генов составляли индивидуальные различия. Межиндивидуальные различия суммарной активности, определяемые комбинаторикой родительских хромосом, ранее отмечались и другими исследователями [107, 122, 180].

Особый интерес представляло сопоставление активности ЯОР хромосом цитотрофобласта с другими эмбриональными тканями. Известно, что гены рРНК являются ключевым компонентом путей клеточной сигнализации, контролирующих рост и пролиферацию клеток [652]. Учитывая активный рост ворсин хориона при формировании хорион-аллантаоидной плаценты и интенсивную пролиферацию клеток цитотрофобласта [734], а также увеличение активности ЯОР в быстро делящихся клетках [140, 238, 631], логично предполагать увеличение транскрипционной активности *p*-генов в клетках цитотрофобласта по сравнению с другими эмбриональными тканями. Результаты исследований, однако, свидетельствуют об отсутствии явных отличий активности ЯОР в клетках цитотрофобласта по сравнению с другими эмбриональными тканями [122, 146].

Следует отметить, что имеющиеся сведения о влиянии типа ткани на функционирование *p*-генов противоречивы. Согласно одним авторам, функциональный статус ЯОР в эмбриональных клетках не зависит от тканевой принадлежности и соответствует таковому в бласттрансформированных лимфоцитах периферической крови взрослых [117, 146, 180]. Результаты других исследований, напротив, свидетельствуют о значительной вариабельности экспрессии *p*-генов в разных тканях одного индивидуума [278, 600, 629]. Причины наблюдаемых различий не совсем ясны. Не исключено, однако, что они обусловлены методическими особенностями приготовления препаратов, в частности, использованием в большинстве исследований клеточных культур. Между тем, условия *in vitro*, возможно через механизм метилирования ДНК [22, 422], могут существенно влиять на экспрессию рибосомных генов [261].

Таким образом, в клетках различных тканей у эмбрионов человека 6–14 недель развития как по числу Ag⁺-ЯОР хромосом, так и по суммарной активности локализованных в них p-генов, наблюдается

межхромосомный, межклеточный и межиндивидуальный полиморфизм, не отличающийся по диапазону от функционального полиморфизма ЯОР в постнатальный период онтогенеза.

Как показывают наши исследования, суммарная транскрипционная активность ЯОР у эмбрионов человека 6–14 недель развития возрастает по мере развития плода (рис. 10.3), тогда как зависимость числа Ag^+ -ЯОР хромосом на клетку от срока беременности прослеживается не столь отчетливо.

Увеличение транскрипционной активности рибосомных генных кластеров носит хромосом-специфичный характер. Так, *p*-гены, локализованные на хромосомах группы G, экспрессируются интенсивнее, чем на хромосомах группы D. Так как число Ag^+ -ЯОР хромосом не зависит от стадии эмбриогенеза, увеличение уровня суммарной активности ЯОР можно объяснить большей функциональной активностью *p*-генных кластеров хромосом 21 и 22, по сравнению с хромосомами 13, 14, 15 [146].

Предполагается, что наследуемая программа экспрессии рибосомных генов реализуется за счет «резервных» молчащих *p*-генов [103], которые, возможно, могут активироваться в связи с необходимостью интенсивного белкового синтеза в процессе эмбриогенеза. При этом число резервных *p*-генов варьирует на разных акроцентрических хромосомах, и их активация может происходить неравномерно. В частности, хромосома 21, по сравнению с другими ЯО-хромосомами, содержит наибольшее число молчащих копий рибосомных генов, а хромосома 15 имеет пониженную активность и является наиболее низкокопийной по содержанию *p*-генов [103].

Таким образом, *основной причиной полиморфизма ЯОР хромосом эмбрионов человека является комбинаторика родительских ЯОР хромосом, определяющая индивидуальные различия.* Нельзя, однако, исключить и наличия реальных молекулярных механизмов репрессии/дерепрессии *p*-генов, регулирующих модуляции их активности в процессе онтогенеза. Согласно последним данным [450], регуляция активности ЯОР районов может осуществляться с помощью одного из трех механизмов: элиминации части рДНК, ее метилирования, эффекта положения гетерохроматиновых районов. Какой из этих механизмов модуляции активности ЯОР превалирует в эмбриогенезе человека остается неизвестным и требует специального изучения.

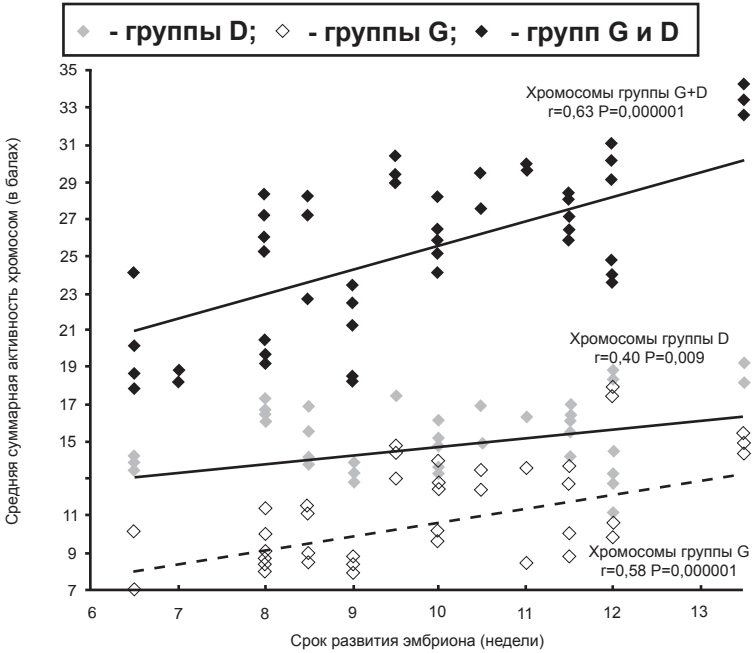


Рис. 10.3. Динамика активности ЯОР хромосом в цитотрофобласте у эмбрионов человека с нормальным кариотипом в 6–14 недель развития

В 6–14 недель, во время активного органогенеза, интенсивность транскрипции *p*-генов возрастает. Можно предполагать, что этот феномен обусловлен увеличением числа работающих копий генов и/или скоростью транскрипции, а не увеличением числа аргентофильных ЯО-хромосом. Двухступенчатая модель активации *p*-генов (см. выше) хорошо согласуется с этим предположением. Согласно данной модели, первичная активация транскрипции происходит в ядрышковых организаторах с наибольшим числом рибосомных цистронов; активация других ЯОР начинается только после завершения транскрипции предыдущего. Другой причиной полиморфизма ЯОР является срок эмбрионального развития, который в большей степени сказывается на хромосомах группы G, нежели группы D. Эти результаты указывают на различную функциональную значимость хромосом G и D в эмбриогенезе человека.

10.1.3.2. Полиморфизм ЯОР у плодов 20–24 недель развития

Для характеристики состояния ЯОР в эмбриогенезе человека во второй половине беременности были проведены исследования метафазных хромосом из ФГА-стимулированных лимфоцитов пуповинной крови, полученной при кордоцентезе, от 43 плодов с нормальным кариотипом ($2n = 46$) в срок 20–24 недель беременности. В 22 случаях пренатальное кариотипирование было выполнено в связи с высоким риском хромосомных болезней у плода: возраст матери 39 лет и старше, наличие хромосомной болезни или множественных пороков развития у предыдущего ребенка (группа 1). В 8 случаях — для выработки тактики родоразрешения в связи с наличием у плода пороков развития, выявленных при ультразвуковом исследовании (группа 2), и в 13 — с целью пренатальной диагностики генных болезней (группа 3).

У всех плодов наблюдалась межклеточная и межиндивидуальная вариабельность числа Ag^+ -хромосом и активности их ЯОР. Ранжирование случаев по возрастанию суммарной активности ЯОР хромосом позволили сформировать группы сравнения, которые, что оказалось неожиданным, соответствовали показаниям для проведения кордоцентеза. Интересно, что в группах плодов, имевших повышенный риск хромосомных болезней (группа 1), или пороки развития, не совместимые с живорождением и постнатальным развитием (группа 2), среднее число Ag^+ -хромосом на клетку оказалось выше, чем у плодов с популяционным риском хромосомных болезней (группа 3). В группах 1 и 2 были сильнее выражены межклеточная и межиндивидуальная вариабельность суммарной активности ЯОР по сравнению с группой контроля (табл. 10.1). Сравнение полигонов частот ЯОР показало, что распределения суммарной активности ЯОР между тремя группами различны (рис. 10.4), однако они хорошо соответствуют представлениям о пределах варьирования активности ЯОР хромосом в популяции здоровых индивидов с нормальным кариотипом [101, 107]. Так, в контрольной группе суммарная активность ЯОР фактически не выходила за пределы таковой для взрослой популяции и составляла 18–26 баллов (табл. 10.1).

У плодов с высоким риском анеуплоидии и с пороками развития отмечена значительная вариабельность активности ЯОР, а также ее смещение в сторону увеличения (19–38 баллов) (табл. 10.1, рис. 10.4). Эти

Таблица 10.1. Полиморфизм числа Ag^+ -ЯОР хромосом и суммарной активности ЯОР в ФГА-стимулированных лимфоцитах пуповинной крови у плодов 20–24 недель развития (собственные данные)

Группы плодов		Число плодов	Среднее число Ag^+ -ЯОР хромосом на клетку	Пределы вариабельности суммарной активности ЯОР (в баллах)
1	Высокий риск хромосомной болезни у плода	22	$8,37 \pm 0,104^*$	$19,3 \pm 2,39$ — $37,2 \pm 1,83$
2	Грубые пороки развития у плода	8	$8,67 \pm 0,131^*$	$19,0 \pm 2,76$ — $38,3 \pm 1,07$
3	Контрольная группа (высокий риск моногенных болезней у плода)	13	$7,25 \pm 0,081$	$16,9 \pm 1,09$ — $29,5 \pm 0,70$

* $P < 0,05$.

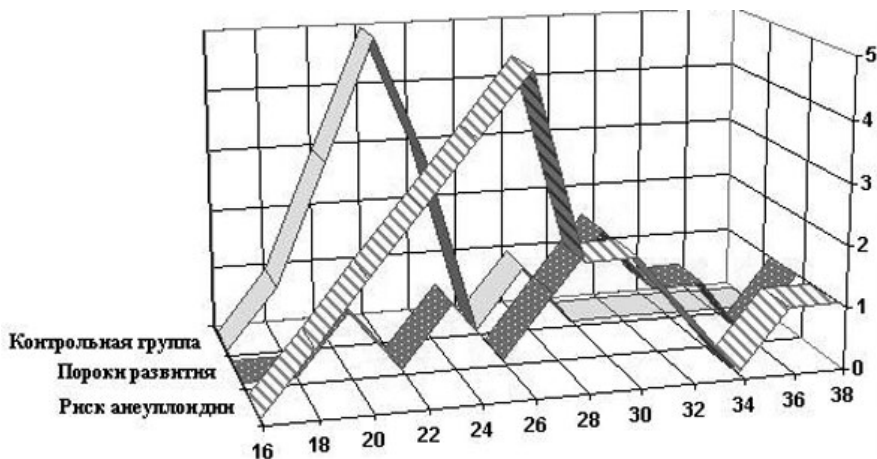


Рис. 10.4. Распределение суммарной активности ЯОР хромосом в ФГА-стимулированных лимфоцитах из пуповинной крови плодов человека с нормальным кариотипом в 20–24 недели развития. По оси абсцисс — средняя активность ЯОР на клетку (в баллах), по оси ординат — число плодов

наблюдения хорошо согласуются с результатами сравнительного исследования полиморфизма ЯОР хромосом у спонтанных абортусов 9–16 недель беременности [117]. Хотя сравнение данных разных авторов затруднено вследствие различий критериев визуальной оценки активности ЯОР, нельзя не обратить внимания на общую тенденцию к смещению в сторону увеличения суммарной активности ЯОР у плодов с пониженной жизнеспособностью. Логично предположить, что процессы, связанные с нарушением жизнеспособности плода и приводящие к его внутриутробной гибели и/или спонтанному прерыванию беременности, существенно влияют и на функциональную активность *p*-генов.

Угрозой прерывания беременности, по-видимому, можно объяснить и смещение распределения суммарной активности ЯОР у плодов группы цитогенетического скрининга (группа 1). Предполагается, что у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом увеличение суммарной активности ЯОР в геноме может быть связано с адаптивными механизмами ответа системы рибосомных генов на неблагоприятные условия развития [117]. К сожалению, мы не располагаем сведениями о дальнейшем течении этих беременностей и их исходах. Нельзя, однако, исключить и другие причины увеличения суммарной активности ЯОР хромосом у плодов этой группы. В частности, у родителей детей с синдромом Дауна обнаружена высокая частота экстремальных вариантов ЯОР, в т. ч. двойных ЯОР [857]. Кроме того, некоторые авторы отмечают тенденцию к увеличению активности *p*-генов у женщин по мере увеличения репродуктивного возраста [117]. В любом случае, плоды именно таких родителей могут унаследовать хромосомы с повышенной экспрессией *p*-генов, что и определяет наличие у них высокого уровня суммарной активности ЯОР. Для проверки данного предположения необходимы сведения о функциональном статусе ЯОР родительских хромосом и изучение характера их наследования.

Таким образом, при исследовании функционального полиморфизма ЯОР у плодов человека во втором триместре беременности установлено, что *пределы variability суммарной активности p-генов у плодов, матери которых имели невысокий риск рождения ребенка с хромосомной патологией, соответствуют установленным у здоровых индивидов после рождения. В то же время, при наличии у плодов с нормальным кариотипом пороков развития, несовместимых с жизнью, экспрессия p-генов возрастает.* Аналогичная, но менее однознач-

ная ситуация наблюдается и для плодов у беременных групп высокого риска рождения ребенка с хромосомной болезнью. Увеличение активности ЯОР хромосом в лимфоцитах плода, по-видимому, свидетельствует о менее благоприятном прогнозе для внутриутробного развития. Выявленные нами закономерности функциональной гетерогенности ЯОР у плодов в зависимости от факторов риска хромосомной патологии требуют дальнейших исследований.

10.1.4. Особенности наследования функциональной активности ЯОР

Как уже отмечалось (см. раздел 10.1.1), активность ЯОР на 1–2 хромосомах изменяется от клетки к клетке и от поколения к поколению при сохранении неизменной копийности кластеров *p*-генов [180, 505, 830].

Представляло интерес идентифицировать акроцентрики с переменными ЯОР и определить характер наблюдаемых изменений в зависимости от родительского происхождения хромосом. Для решения этих задач структурно-функциональное состояние ЯОР хромосом было прослежено в 14 полных семьях, т. е. в клетках цитотрофобласта хориона/плаценты у эмбрионов/плодов 8–19 недель развития с нормальным кариотипом, а также в лимфоцитах периферической крови их родителей. При анализе наследования ЯОР индивидуальных хромосом использовали два параметра — размер кластера *p*-генов и их транскрипционную активность. Используя в обоих случаях 4-балльную систему визуальной оценки, о копийности судили по величине гибридационного сигнала после FISH с рДНК-зондом [3], об аргентофильности ЯОР — по размеру гранул серебра [107]. Для каждого индивида было проанализировано не менее 11 метафазных пластинок.

Сравнительный анализ 140 ЯОР хромосом у плодов и их родителей с учетом поправки на межклеточную переменность показал, что в большинстве случаев (101 хромосома, 73 %) структурно-функциональный статус ЯОР сохраняется при наследовании, тогда как в 39 (27 %) он оказался измененным. При этом число хромосом с нестабильной активностью ЯОР варьировало от 1 до 4, преимущественно составляя 2–3 на клетку. Наблюдаемые различия касались преимущественно изменения аргентофильности. Лишь у двух эмбрионов было отмечено отсутствие активности ЯОР, которое было вызвано делецией кластера рибосомных генов на хромосомах 14 и 15, унаследованных от матери [136, 527].

Анализ состояния ЯОР хромосом в пределах групп показал, что при наследовании активность ЯОР была изменена у 17 из 84 хромосом группы D (20%) и у 19 из 37 хромосом группы G (51%), т. е. активность кластеров *p*-генов на хромосомах группы G характеризуется большей изменчивостью, чем на хромосомах группы D.

При исследовании ЯОР индивидуальных хромосом оказалось, что чаще других меняется активность ЯОР хромосомы 21 (33% от всех переменных ЯОР), в три раза реже — ЯОР хромосомы 14 (4 случая из 39). Изменчивость ЯОР остальных хромосом регистрируется примерно с одинаковой частотой (по 17–19% для ЯОР хромосом 13, 15 и 22). При этом для ЯОР хромосом 13, 15, 21 и 22 с неизменной структурой было зарегистрировано как увеличение, так и уменьшение активности (в 47% и 53% соответственно). Только ЯОР хромосомы 14 во всех 4 случаях, включая случай полной делеции кластера *p*-генов, проявлял пониженную по сравнению с таковой у родителей активность.

Хромосомы 13, 14, 21 и 22 с переменными ЯОР имели как материнское, так и отцовское происхождение. В случае хромосомы 15 нестабильная активность ЯОР была присуща только гомологу отцовского происхождения, тогда как гомолог материнского происхождения характеризовался стабильным наследованием транскрипционной активности ЯОР.

Таким образом, семейный анализ индивидуальных ЯОР показал, что размеры кластеров *p*-генов наследуются в 98,6%, тогда как их транскрипционная активность характеризуется стабильным состоянием в 73% случаев. Изменению активности подвержены примерно 1/4 ЯОР хромосом у эмбрионов, что в 2,5 раза превышает долю переменных ЯОР у взрослых индивидов и их родителей, т. е. в постнатальном периоде онтогенеза [505, 601]. Наличие в кариотипе эмбрионов большего числа переменных ЯОР можно объяснить отбором, направленным на поддержание определенной «адаптивной» дозы активных копий *p*-генов на уровне, необходимом для обеспечения нормальной жизнедеятельности [199].

Следует отметить, что в цитотрофобласте число хромосом с переменными ЯОР составляло от 1 до 4 на клетку, при этом у разных эмбрионов увеличение или уменьшение активности затрагивало ЯОР хромосом, имеющих различное родительское происхождение, пре-

имущественно хромосом группы G. В какой-то мере это может быть обусловлено различиями в сроках развития исследованных эмбрионов [146, 559].

Разный вклад в функциональный полиморфизм ЯОР разных акроцентрических хромосом еще раз подтверждает гипотезу о существовании тенденции к функциональной дифференциации ЯОР хромосом группы D и G [3]. При этом ЯОР разных хромосом, отличаясь друг от друга числом копий генов рРНК, имеют разное функциональное значение. Высокая доля хромосом группы G, отличающихся по активности от родительских ЯОР, не противоречит высказанному ранее предположению о большей функциональной значимости рибосомных генных кластеров хромосом 21 и 22, нежели хромосом 13, 14, 15, по крайней мере, в период интенсивного органогенеза [146].

Закономерно возникает вопрос о том, какие механизмы лежат в основе различной функциональной активности ЯОР разных акроцентрических хромосом. Можно предположить, что определенный вклад в дифференциальную экспрессию рибосомных генных кластеров разных хромосом вносят, во-первых, различия в регуляторных областях этих кластеров, а во-вторых, уникальные особенности прилежащих к ним сателлитных ДНК.

Известно, что последовательности, кодирующие рРНК, чрезвычайно консервативны, однако существует межвидовой и внутривидовой полиморфизм по спейсерным участкам, обусловленный преимущественным распределением специфически метилированных вариантов спейсерных участков по определенным парам акроцентрических хромосом [866]. В спейсерных участках, разделяющих *p*-гены, локализованы также последовательности, влияющие на рекомбинацию и инициацию репликации, а также определяющие уровень транскрипции рДНК [446]. Таким образом, в основе специфических систем контроля транскрипционной активности ЯОР разных пар акроцентрических хромосом может лежать дивергенция спейсерных участков негомологичных акроцентрических хромосом.

Еще одной причиной неслучайного распределения вариантов Ag⁺-ЯОР по разным парам акроцентрических хромосом являются качественные и количественные различия в составе фланкирующих рДНК сателлитных последовательностей, которые по типу эффекта положения могут оказывать определенное влияние на функционирование

p-генов [450, 679]. По сатДНК, входящих в состав блоков прицентромерного гетерохроматина и спутников, наиболее близки хромосомы 13 и 21 [198, 201, 298, 582]. Показана также высокая степень гомологии сателлитных последовательностей хромосом 14 и 22 [299]. В то же время для коротких плеч хромосом 15 характерен иной набор групп сатДНК [690]. Эти данные позволяют предполагать, что гомология по сатДНК хромосом 13 и 21, а также 14 и 22 способствует их ассоциации в мейозе и, следовательно, увеличивает частоту рекомбинации по коротким плечам этих хромосом. При этом негомологичная рекомбинация может приводить к «гомогенизации» не только сателлитных последовательностей [298], но и рибосомных генов этих хромосом. В то же время процесс негомологичной рекомбинации между короткими плечами хромосомы 15 и другими акроцентрическими хромосомами затруднен из-за дивергенции последовательностей сатДНК в прицентромерных районах [876]. Не исключено, что пониженная рекомбинация и дивергенция сатДНК хромосомы 15 влияет также на смежные участки, приводя к дивергенции спейсерных участков, участвующих в регуляции активности *p*-генов.

Любопытно, что в отличие от ЯОР хромосом 13, 14, 21 и 22, вариабельность которых не связана с их родительским происхождением, активность ЯОР хромосомы 15 в клетках цитотрофобласта зависит от ее родительской принадлежности. Так, согласно полученным нами данным [136, 527], активность ЯОР хромосом 15, унаследованных от отца, часто оказывается вариабельной, в то время как активность ЯОР материнских хромосом 15 наследуется как стабильный признак. Таким образом, особенности функционирования ЯОР хромосомы 15 в клетках цитотрофобласта определяются ее родительским происхождением.

Наиболее известным примером зависимости транскрипционной активности кластеров рибосомных генов от их родительского происхождения является феномен ядерного доминирования, обнаруженный у межвидовых гибридов животных и растений, а также в гибридных соматических клетках млекопитающих [748]. Ядерное доминирование представляет собой экспрессию кластеров генов рРНК только одного родителя и инактивацию *p*-генных кластеров другого, при этом степень репрессии одного из кластеров рДНК может изменяться [295]. Репрессия *p*-генов осуществляется за счет обратимых эпигенетических изменений, в которых ключевую роль отводят метилированию

ДНК и деацетилированию гистонов [294], т. е. тем же механизмам, которые регулируют дозу активных рибосомных генов в геноме [370]. Интересно отметить, что на выбор того, какой из родительских ЯОР будет инактивирован, влияет не только метилирование регуляторных последовательностей рибосомных генов, но и других, иногда достаточно удаленных последовательностей, которые могут входить в состав регуляторных элементов других генов этой ЯО-хромосомы [294, 295].

Можно предположить, что в основе выявленных нами особенностей наследования функциональной активности ЯОР хромосом 15 лежат сходные механизмы. Во-первых, значительное влияние на функционирование ЯОР могут оказывать другие локусы, расположенные на этой хромосоме. В частности, в проксимальном районе длинного плеча хромосомы 15 (15q) локализован кластер из 10 импринтированных генов, активность которых определяется процессами метилирования [128]. Блоки метилированной ДНК, как правило, присутствуют и в коротких плечах хромосом 15, в то время как степень метилирования ЯО других хромосом существенно ниже [687].

Таким образом, особенности первичной организации (последовательности ДНК), а также конформационные изменения хроматина, возможно, и определяют активность *p*-генов хромосомы 15 в зависимости от их родительского происхождения в клетках цитотрофобласта эмбрионов человека с нормальным кариотипом на 8–19 неделях развития. Безусловно, выявление возможных причин и механизмов зависимой от родительского происхождения активности ЯОР, в т. ч. и хромосомы 15, требует дальнейшего углубленного изучения с использованием комплексных цитогенетических и молекулярно-биологических подходов.

10.1.5. Функциональный полиморфизм ЯОР у плодов человека с анеуплоидным кариотипом

Принимая во внимание количественную и качественную варибельность ЯОР хромосом, а также значимость работы *p*-генов для жизнедеятельности любой клетки, их ключевую роль в клеточной сигнализации и участие в процессах дифференцировки, несомненный интерес представляет выяснение варьирования активности ЯОР в клетках плодов при хромосомном дисбалансе. Особый интерес в этом отношении представляют синдромы, обусловленные трисомиями хромосом 21 (синдром Дауна) и 13 (синдром Патау) — наиболее

частые хромосомные болезни человека. Поскольку в анеуплоидии при этих синдромах принимают участие ядрышкообразующие хромосомы, это неизбежно должно отразиться на работе системы генов рибосомного биогенеза, в частности, генов рРНК. Основное внимание в нашем исследовании было уделено анализу влияния дополнительной ЯО-хромосомы на функциональный статус ЯОР других хромосом в кариотипе эмбрионов.

Анализ структурно-функционального состояния ЯОР хромосом был проведен в 14 полных семьях, т. е. в клетках цитотрофобласта или лимфоцитах пуповинной крови от 7 эмбрионов с трисомией 21 и 7 эмбрионов с трисомией 13, а также в лимфоцитах периферической крови их родителей. При анализе были использованы методические приемы, аналогичные ранее описанным.

Дополнительная хромосома у всех плодов с трисомией 21, а также у 4 плодов с трисомией 13 имела материнское происхождение в результате нерасхождения в первом делении мейоза. Три случая трисомии 13 были обусловлены аномальной сегрегацией хромосом в сперматогенезе (в одном случае в первом делении, в двух — во втором делении мейоза).

Сравнительный анализ 154 (по 77 для каждого типа трисомии) индивидуальных ЯОР хромосом у плодов и их родителей показал, что в 68 % случаев функциональный статус ЯОР сохранялся при наследовании. Хромосомы с варьируемыми ЯОР составили 32 %, что оказалось на 5 % больше, чем при анализе плодов с нормальным кариотипом (см. раздел 10.1.3). У плодов с трисомиями 21 и 13 отмечена также тенденция к увеличению числа варьируемых ЯОР хромосом (2–6 на клетку по сравнению с 1–4 при нормальном кариотипе у плода). Интересно также отметить, что у плодов с трисомиями 21 и 13, несмотря на участие в анеуплоидии хромосом разных групп, доли хромосом групп D и G с измененной активностью ЯОР были сопоставимы (табл. 10.2). При этом в случае трисомии 21 каждый ЯОР вносил равный вклад в общую изменчивость транскрипционной активности, а при трисомии 13 чаще других менялась активность ЯОР именно на хромосомах 13 (рис. 10.5). Попытки установить влияние родительской принадлежности хромосомы на изменения активности ее ЯОР оказались безуспешными — ни для одной акроцентрической хромосомы у плодов с трисомией 21 или 13 такой зависимости выявлено не было.

Таблица 10.2. Характер наследования активности ЯОР хромосом у эмбрионов с нормальным кариотипом и трисомией по хромосомам 13 и 21 (собственные данные)

	Кариотип эмбрионов		
	Нормальный	Трисомия 21	Трисомия 13
Число эмбрионов	14	7	7
Общее число исследованных ЯОР хромосом	140	77	77
Число хромосом с измененной активностью ЯОР по сравнению с таковой у родителей в том числе:	36 (26 %)	22 (29 %)	25 (32 %)
группы D (из всех хромосом группы D)	17 из 84 (20 %)	12 из 42 (29 %)	15 из 49 (31 %)
группы G (из всех хромосом группы G)	19 из 37 (33 %)	10 из 35 (29 %)	10 из 25 (35 %)
с увеличенной активностью ЯОР	17* (47 %)	1* (5 %)	2* (8 %)
со сниженной активностью ЯОР	19* (53 %)	21* (95 %)	23* (92 %)

* Достоверные различия между группами эмбрионов в норме и патологии

При анализе характера изменения активности ЯОР установлено, что у эмбрионов с трисомиями активность ЯОР, как правило, снижена по сравнению с исходной родительской (табл. 10.2). При этом только у двух эмбрионов с трисомией 21 это снижение явилось следствием делеции кластеров рибосомных генов на отцовских хромосомах 21 и 15.

Сравнение интенсивности Ag-окраски отдельных акроцентрических хромосом в цитотрофобласте между эмбрионами с нормальным кариотипом и трисомиями показало, что в присутствии любой дополнительной ЯО-хромосомы активность всех ЯОР увеличивается. Достоверная разница в интенсивности Ag-окраски наблюдалась по ЯОР всех хромосом группы D (хромосомы 13 и 15 при трисомии 13 и хромосомы 14 при трисомии 21) и хромосомы 22 только при трисомии 13. При анализе суммарной активности ЯОР хромосом у плодов с нормальным и анеуплоидным кариотипом обнаружены различия как по средней активности ЯОР на геном, так и по характеру распределения (рис. 10.5).

Полученные данные хорошо согласуются с результатами исследования активности ЯОР у спонтанных абортусов [117] и свидетельствуют, что при любом анеуплоидном кариотипе, особенно при трисомиях

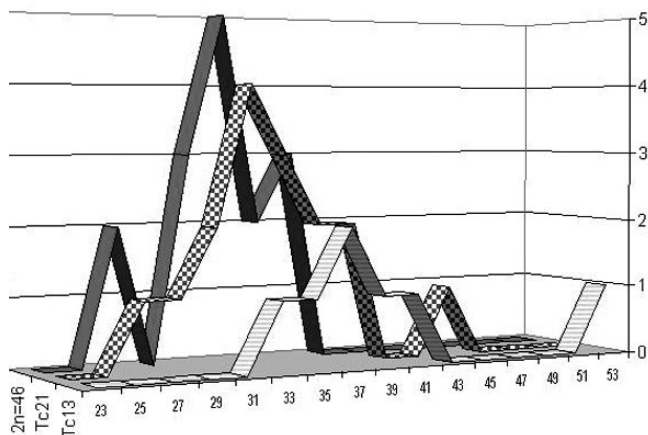


Рис. 10.5. Распределение суммарной активности ЯОР хромосом в клетках цитотрофобласта хориона, плаценты и ФГА-стимулированных лимфоцитах из пуповинной крови плодов человека с нормальным кариотипом ($n = 15$), трисомией 21 ($n = 16$), и трисомией 13 ($n = 7$). По оси абсцисс — средняя суммарная активность ЯОР на клетку (в баллах), по оси ординат — число плодов

по ЯО-хромосомам, общий уровень экспрессии p -генов возрастает. Это увеличение особенно демонстративно у пациентов с синдромом Дауна и у лиц с дополнительными маркерными ЯО-хромосомами [107, 657, 705, 904]. Повышение суммарной активности p -генов в таких клетках происходит за счет активации дополнительных ЯОР. При этом аргентофильные характеристики других хромосом либо сохраняются, как это отмечено при исследовании мозаичных кариотипов [705, 904], либо уменьшаются, как это обнаружено у эмбрионов с трисомией 21 и 13 (см. выше). В случаях утраты ЯОР, например, в результате Робертсоновской транслокации по ЯО-хромосомам, общий уровень активности, как правило, снижается при относительном увеличении активности других индивидуальных ЯОР [669]. Несмотря на то, что изменения активности могут оказаться недостаточными для достижения оптимального уровня, характерного для нормального кариотипа, эти данные могут служить косвенным доказательством существования компенсаторного механизма дозы p -генов в клетке. Компенсация дозы может осуществляться путем модификации активности ЯОР родительских хромосом на стадии зиготы. При этом жизнеспособными оказы-

ваются только клетки с числом активных ЯОР, не выходящим за рамки нормального диапазона изменчивости [107, 669].

Жесткий отбор по числу аргентофильных ЯОР справедлив только при допущении, что активность ЯОР индивидуальной хромосомы неизменна. Между тем, в норме активно транскрибируется не более половины всех *p*-генов [652], при этом активность некоторых ЯОР может изменяться как в сторону увеличения, так и уменьшения в зависимости от их сочетания в конкретном кариотипе для «настройки» оптимального числа активных генов рРНК в клетке. Эти изменения могут иметь стадиоспецифичный характер. Поэтому логично предположить, что и при нормальном кариотипе, и при частичной анеупloidии по ЯОР, уже на самых ранних стадиях развития определяется число копий *p*-генов, диапазон их активности, а также оптимальный уровень транскрипции. При наличии в кариотипе целой дополнительной ЯО-хромосомы многие параметры функционирования индивидуальных ЯОР, характерные для нормального кариотипа, нарушаются. Так, согласно нашим данным, при трисомиях 21 и 13 заметно возрастает по сравнению с нормальным кариотипом доля хромосом группы D с переменными ЯОР. Любопытно, что несмотря на общую тенденцию к снижению активности ЯОР родительских хромосом, общий уровень транскрипции *p*-генов не только заметно выше нормального, но и в значительной степени обусловлен высокой активностью ЯОР хромосом группы D, преимущественно хромосомы 13. Наконец, при трисомиях ни для одной из хромосом не установлено зависимости функционирования ее ЯОР от родительской принадлежности. Этот факт, возможно, указывает на то, что в условиях хромосомного дисбаланса регуляция работы всей системы генов рРНК, если и осуществляется, то иначе, чем в норме.

Следует отметить, что при таких сублетальных трисомиях как трисомии 13 и 21 вклад дополнительной дозы активных *p*-генов на фоне дисбаланса генетического материала целой хромосомы дискриминировать достаточно трудно. Поэтому вопросы о влиянии добавочных ЯОР на работу системы *p*-генов, а также всего генома по-прежнему остаются открытыми.

Особый интерес вызывают механизмы взаимодействия, регуляции и контроля дифференциальной транскрипции генов, в том числе и генов рРНК, специфичных для каждого родительского ЯОР [84]. Одним из таких универсальных механизмов является уже упоминавшееся

метилование ДНК, которому отводят ключевую роль в регуляции транскрипции на уровне всего генома. Учитывая важную роль метилирования в реализации генетической программы эмбрионального развития человека, представляется целесообразным подробно рассмотреть существующие на эту тему данные.

10.2. Метилирование ДНК как универсальный механизм регуляции активности генов

В реализации наследственной информации на разных стадиях онтогенеза решающая роль принадлежит процессам молекулярной и надмолекулярной (эпигенетической) регуляции функции генома. *Под эпигенетической изменчивостью понимают изменения дифференциальной экспрессии генов, наследуемые в ряду митотических делений клетки без нарушения нуклеотидной последовательности ДНК.* В настоящее время описаны два молекулярных эпигенетических механизма: модификация гистонов и метилирование ДНК.

Метилирование — обратимая ковалентная модификация ДНК, происходящая в результате присоединения метильной группы к углероду в 5-м положении цитозинового нуклеотида с образованием 5-метилцитозина.

В геномах млекопитающих, в том числе у человека, 5-метилцитозин преимущественно входит в состав динуклеотидов 5'-СрG-3' (так называемые СрG-динуклеотиды) — 70–80% цитозина в составе СрG-динуклеотидов представлены 5-метилцитозином [231, 817]. Их небольшое число содержится в последовательностях 5'-СрNpGr-3' или асимметричных последовательностях 5'-СрA-3' и 5'-СрT-3' [673]. В процессе эволюции происходит постепенная элиминация СрG-динуклеотидов, в результате чего их доля в геномах высших эукариот составляет только 5–10% от теоретически ожидаемой [232]. Метилирование играет важную роль в этом процессе, т. к. потеря большинства СрG-сайтов обусловлена превращением метилированного цитозина в тимин в результате спонтанного дезаминирования (рис. 10.6).

Распределение СрG-динуклеотидов по различным участкам генома млекопитающих неравномерно. В *транскрипционно инертном хроматине (гетерохроматине)* СрG-динуклеотиды расположены с частотой приблизительно 1 : 80. *Гетерохроматин* характеризуется наличием метилированной, поздно реплицирующейся ДНК, труднодо-

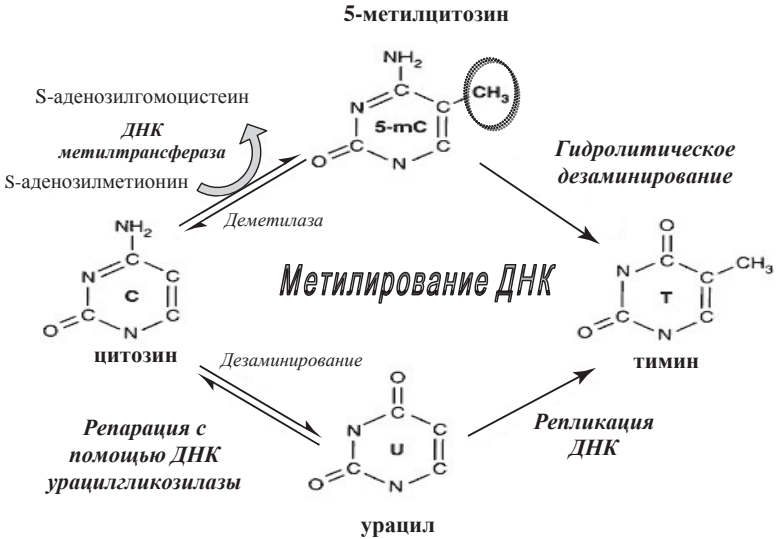


Рис. 10.6. Схема взаимного превращения цитозина и 5-метилцитозина и их мутационные изменения

ступной для транскрипционных факторов, а также соответствующим набором гистонов и специфической нуклеосомной организацией. Для **функционально активного хроматина (эухроматина)** более характерны участки ДНК (500–5000 п. н.), называемые CpG-островками, в которых плотность CpG-динуклеотидов в пять раз больше, чем в среднем по геному. Цитозин в эухроматине, как правило, находится в неметилированном состоянии. Хроматин, содержащий CpG-островки, мало спирализован, отличается высокой степенью ацетилирования коровых гистонов, практически полным отсутствием гистона H1 и слабо выраженной нуклеосомной организацией. Все эти особенности строения ДНК эухроматина позволяют ему активно взаимодействовать с **транскрипционными факторами**. Согласно последним данным, в геноме человека насчитывается около 29 000 CpG-островков, которые в основном расположены в промоторных областях и/или экзонах всех генов «домашнего хозяйства» (house keeping genes) и некоторых тканеспецифичных генов [326, 869].

Основными ферментами, обеспечивающими процесс метилирования в эукариотической клетке, являются метилтрансферазы. На се-

годняшний день идентифицировано три метилтрансферазы: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. Ген метилтрансферазы-1 мыши (*Dnmt1*) высококонсервативен [256], и его ортологи идентифицированы у разных видов, в том числе и у человека (*DNMT1*) [512]. Продукт гена *Dnmt1* поддерживает метилированное состояние ДНК в делящихся клетках. Метилируя вновь синтезированную ДНК, метилтрансфераза-1 обеспечивает воспроизведение родительского паттерна метилирования в дочерних цепях ДНК после каждого раунда репликации (рис. 10.7). Отсутствие фермента приводит к снижению общего уровня метилирования и гибели эмбрионов [572]. Однако эмбриональные стволовые клетки таких мышей жизнеспособны и сохраняют способность к метилированию *de novo*, что указывает на наличие других метилаз [349]. Именно к таким метилазам относятся ферменты *Dnmt3a* и *Dnmt3b* [689]. Совместное действие метилаз приводит к метилированию CpG-динуклеотидов в неметилированной и полуметилированной ДНК *in vitro* [688] (рис. 10.7).

Мутации в гене DNMT3B человека, приводящие к инактивации каталитического домена фермента, идентифицированы у пациентов с ICF-синдромом (Immunodeficiency, Centromeric instability, Facial anomalies) Синдром ICF — аутосомно-доминантное заболевание, ос-

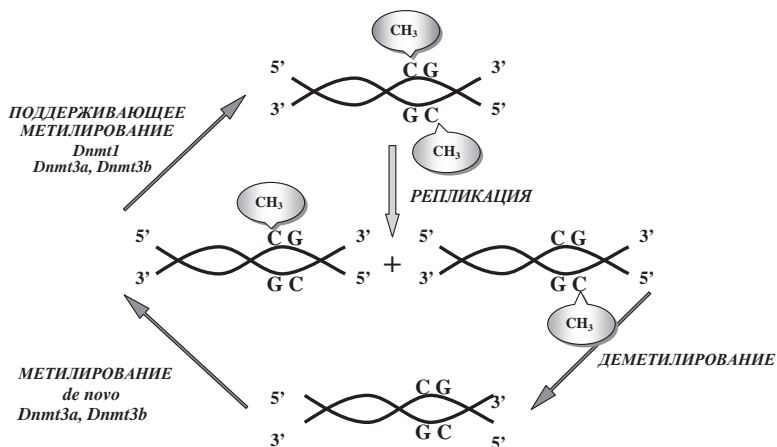


Рис. 10.7. Метилирование *de novo* и сохранение родительских схем метилирования в раундах репликации

новными клиническими признаками которого являются лицевые аномалии, дефицит IgA и T-клеток, инфекции верхних дыхательных путей и склонность к злокачественным новообразованиям. Цитогенетической характеристикой синдрома является нестабильность центромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16 и реже 2 и 10, возникающая вследствие их гипометилированного состояния [306].

Статус метилирования в клетке может изменяться под влиянием вредных факторов окружающей среды, в частности, тяжелых металлов. Так, внутриклеточное накопление никеля вызывает нарушение в структуре гетерохроматина, что, в свою очередь, приводит к гиперметилированию ДНК и инактивации близлежащих генов [333]. Малые дозы кадмия при краткосрочном воздействии вызывают ингибирование метилтрансферазы и гипометилирование ДНК, в то время как при его долгосрочном воздействии наблюдается обратный эффект, т. е. активация метилтрансферазы и гиперметилирование ДНК [390].

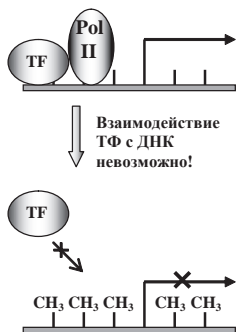
Таким образом, эпигенетические изменения ДНК могут являться одним из способов ответа организма на постоянно изменяющиеся факторы окружающей среды.

Корреляция между экспрессией генов и степенью метилирования ДНК выявлена в начале 1980-х годов [261, 372, 745]. Установлено, что метилирование может влиять на интенсивность транскрипции как путем изменения эффективности связывания позитивных и негативных факторов транскрипции с регуляторными участками генов, так и через формирование неактивных участков хроматина (рис. 10.8) [262, 660].

Согласно первому механизму, 5-метилцитозин ингибирует связывание с ДНК некоторых факторов транскрипции (AP-2, с-Мус/Муп, цАМФ-зависимый активатор CREB, E2F, NF-kB), мишенями для которых являются последовательности, содержащие CpG-нуклеотиды. Однако некоторые транскрипционные факторы (SP-1, CTF) не чувствительны к метилированию и связываются с участками ДНК, лишенными CpG-динуклеотидов (рис. 10.8) [829].

В реализации второго механизма участвуют белки, которые специфично связываются с метилированными CpG-динуклеотидами и ингибируют присоединение к ДНК **факторов транскрипции** (рис. 10.8) [466, 660]. Основная роль в этом процессе принадлежит метилцитозинсвязывающему комплексу (**МЦСК**), состоящему из 5 основных белков: MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 и MeCP2. Все белки этого комп-

1) Прямое взаимодействие с транскрипционным фактором



Примеры ТФ:

Чувствительные к метилированию
AP-2, E2F, NF-κB, CREB, Myc/Mun;

Нечувствительные к метилированию
SP-1, CTCF

2) Специфические транскрипционные репрессоры

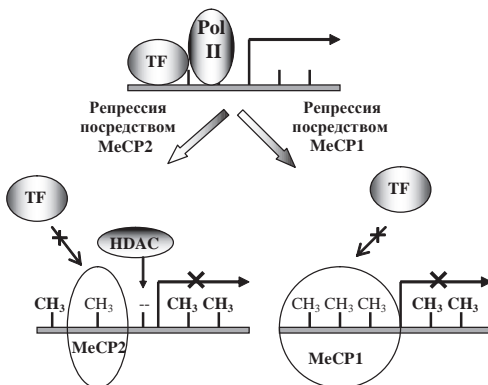


Рис. 10.8. Возможные механизмы репрессии транскрипции посредством изменения метилирования цитозина [792]

лекса, за исключением MBD4, выполняют репрессорную функцию путем изменения структуры хроматина. Белок MBD4 участвует в репарации и предотвращает мутационные изменения метилцитозина [466].

MeCP2 является основным репрессорным белком комплекса МЦСК. При его связывании с одиночными CpG-динуклеотидами репрессорный эффект распространяется на несколько сот пар нуклеотидов. Белок состоит из двух доменов: метилцитозинсвязывающего (MBD), отвечающего за узнавание 5-метилцитозина, и репрессорного (TRD), имеющего сродство к гистондеацетилазе и обеспечивающего блок транскрипции [661]. Взаимодействие ацетилаз с белком MeCP2 определяет ацетилирование около 20% гистонов. Считается, что именно деацетилирование гистонов лежит в основе инактивации гетерохроматина. При помощи специфических антител было установлено, что белок MeCP2 локализован преимущественно в G-сегментах метафазных хромосом. Эмбрионы мыши, гомозиготные

по делеции гена MeCP2, погибают до рождения, что указывает на важную роль белка MeCP2 в эмбриональном развитии [828].

Мутация в гене MeCP2, локализованном в X-хромосоме человека, приводит к развитию прогрессирующего нейродегенеративного заболевания — синдрому Ретта. Характерные симптомы у пациенток начинают проявляться в возрасте от 6 до 18 месяцев в виде прогрессирующей умственной отсталости с утратой речевых способностей, аутизма и атаксии. Мальчики с мутацией этого гена нежизнеспособны и умирают вскоре после рождения [760].

Вторым метилцитозинсвязывающим белком является MBD2. Этот белок, как и гистондеацетилазы HDAC1, HDAC2 и гистонсвязывающие белки RbAp46, RbAp48, входит в состав комплекса MeCP1. В отличие от MeCP2, для связывания с ДНК ему необходимо несколько CpG-динуклеотидов. Учитывая слабое сродство комплекса MeCP1 к метилированной ДНК предполагается, что он выполняет вспомогательные функции в процессе генной репрессии [611].

В настоящее время установлено, что для репрессии транскрипции необходимо как метилирование ДНК, так и деацетилирование гистонов. Остается, однако, неясным, что является первичным, т. е. определяет ли метилирование ДНК изменения в компактизации хроматина, либо изменения в упаковке хроматина маркируют участки ДНК, где должно происходить метилирование *de novo* (рис. 10.9). С одной стороны, специфические последовательности ДНК могут взаимодействовать с метилтрансферазами, а последующее присоединение к ДНК метилцитозинсвязывающих белков и гистонацетилазного комплекса приводит к стабилизации хроматина и невозможности присоединения к ДНК транскрипционного комплекса (рис. 10.9, а). С другой стороны, сама структура хроматина может определять последовательности генома, которые должны подвергаться метилированию *de novo* (рис. 10.9, б). Более вероятно, что вначале осуществляется метилирование определенных последовательностей ДНК, а затем изменяется структура хроматина, в состав которого они входят [666, 744]. Не исключено также, что обе программы просто дополняют друг друга, обеспечивая в процессе клеточной дифференцировки как длительное (перманентное) выключение крупных информационных блоков активного хроматина (конформационные изменения), так и более лабильное (транзиторное) выключение отдельных генов (метилирование).

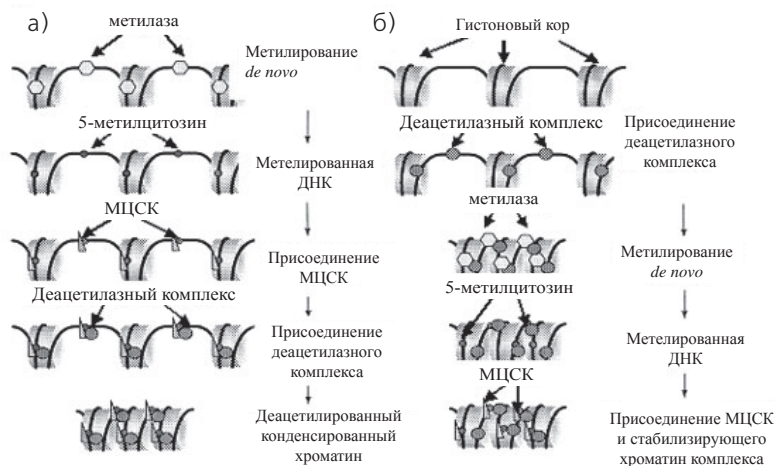


Рис. 10.9. Взаимосвязь между метилированием цитозина в молекуле ДНК и ацетилированием гистонов: а — метилированные участки ДНК определяют локализацию сайтов связывания деацетилазного комплекса; б — присоединение деацетилазного комплекса детерминирует участки, в которых должно происходить метилирование ДНК [666]

Таким образом, метилирование ДНК, влияя на функциональную активность генов и на конформацию хроматина, выполняет множество функций, одни из которых доказаны, другие активно обсуждаются. Так, показана важная роль метилирования в регуляции экспрессии тканеспецифичных генов, в клеточной дифференцировке, в процессах репликации и репарации ДНК, в поддержании геномной стабильности [127]. Предполагается, что метилирование играет важную роль в защите генома от мобильных генетических элементов [256, 682], а также в супрессии «чужеродных» генов, доставленных в клетки с целью коррекции наследственных дефектов [78]. Метилирование в районах с малой плотностью генов, в частности, в участках прицентромерного гетерохроматина, по-видимому, необходимо для стабилизации структуры, поддержания конформации и целостности хромосом [392]. В то же время, метилирование цитозина в составе CpG-динуклеотидов в регуляторных элементах генов, как правило, подавляет экспрессию. Наиболее подробно механизмы репрессии генов, обусловленные метилированием, изучены в отношении такого феномена как *геномный импринтинг* — одного из вариантов эпигенетической наследствен-

ности, при котором специфический характер дифференциальной активности генов определяется полом организма, от которого эти гены унаследованы [19, 20].

10.2.1. Метилирование ДНК и геномный импринтинг

У млекопитающих, насекомых и высших цветковых растений отцовские и материнские гены могут проявлять дифференциальную супрессию уже на ранних стадиях онтогенеза. При этом наблюдается видимое искажение менделевских правил наследования отдельных признаков. В участках генома, подверженных импринтингу, экспрессируется только одна аллель — отцовская или материнская. Иными словами, экспрессия импринтированного гена в организме-потомке определяется его родительским происхождением, то есть зависит от того, передается ли он геномом спермия или яйцеклетки. Данные по геномному импринтингу у человека были суммированы на конференции National Institute of Child Health (USA) [893]. Они подробно рассмотрены в ряде отечественных обзоров и сборников [63, 120, 121, 128].

Молекулярные механизмы этого явления в настоящий момент до конца неясны. Однако доказано, что в механизме импринтинга основная роль принадлежит модификации белков хроматина и ДНК, в частности, процессам ацетилирования гистонов и метилирования генов. Детали импринтинга в родительских половых клетках, его сохранение в клетках эмбриона и роль в регуляции экспрессии генов в эмбриогенезе, долгое время оставались неясными. За последние годы в изучении феномена геномного импринтинга достигнуты серьезные успехи: 1) определены *cis*-действующие последовательности, играющие важную роль в контроле импринтинга, 2) установлено время появления и элиминации импринтов в половых клетках, 3) выяснена динамика метилирования импринтированных генов в пре- и постнатальном онтогенезе, 4) показана кластерная локализация импринтированных генов в геноме, 5) установлена асинхронность репликации импринтированных генов.

Важнейшие события, связанные с геномным импринтингом, происходят еще в гаметогенезе. При этом как в мужских, так и в женских гаметах вначале происходит стирание (удаление) предсуществующих импринтов, унаследованных от родителей, а затем устанавливаются собственные импринты в соответствии с полом особи.

Для развивающихся половых клеток характерна последовательная смена двух событий: тотальное деметилирование ДНК и ее реметилирование. К 12–13 дням эмбрионального развития мышей ДНК в первичных половых клетках находится в неметилированном состоянии независимо от пола зародыша [361, 363]. К 15–16 дням развития происходит реметилирование большинства последовательностей генов (за исключением CpG-островков). При этом различия в характере метилирования отцовских и материнских хромосом сохраняются только в нуклеотидных последовательностях некоторых генов [361, 363].

Следует отметить, что общее деметилирование ДНК, характерное для ранних стадий развития половых клеток, касается также и всех импринтированных генов [843]. Так, показано, что еще на 12,5 день развития в первичных половых клетках импринтированные гены *Igf2r*, *p57*, *Kip2*, *Peg1*, *Peg3*, *Snrpn*, *U2afrs1* находятся в неметилированном состоянии [404, 843]. Единственная последовательность, которая, по-видимому, может избежать общего деметилирования в раннем развитии половых клеток, — это 5'-район гена *Xist*, ответственного за инактивацию одной из X-хромосом у зародышей женского пола, необходимой для компенсации дозы генов [746].

В оогенезе у мышей процесс метилирования *de novo* происходит на стадии роста ооцитов вскоре после рождения. Это было показано для некоторых повторяющихся последовательностей [481], для гена *Igf2r* [843], а также трансгенов — чужеродной ДНК, включенной в геном ооцита [288].

В мужских половых клетках время установления импринтинга точно не выяснено. По всей видимости, метилирование генов *H19* и *Igf2* происходит также вскоре после рождения, о чем косвенно свидетельствует высокий уровень метилтрансферазы *Dnmt1* в ядрах сперматогониев.

После оплодотворения и вплоть до стадии бластоцисты происходит глобальное деметилирование генома зародыша, то есть стираются импринты мужских и женских геномов. У мыши однокопийные гены деметилируются в течение первых делений дробления и остаются гипометилированными до стадии поздней гаструлы. Импринтированные сайты мужского генома деметилируются к 8-клеточной стадии, а полностью гаметический импринтинг стирается уже на стадии морулы (8–16 бластомеров) [646]. Тотальное деметилирование на начальных стадиях дробления, по-видимому, отражает процесс дедифферен-

цировки геномов мужского и женского пронуклеусов и приобретение геномом дробящегося зародыша плюрипотентного состояния. Происходящий на стадии морулы процесс компактизации ведет к первичной дифференцировке на внутреннюю клеточную массу и трофобласту (см. главу 1) и сопровождается быстрой утратой тотипотентности клеток трофобласта. Дальнейшая дифференцировка клеток внутренней клеточной массы с образованием трех зародышевых листков сопровождается установлением характерного для каждого из них паттерна метилирования. Таким образом, происходит активация одних и инактивация других комплексов генов в результате чего формируется окончательная генетическая программа, обеспечивающая нормальное развитие целого зародыша и его отдельных зачатков [448, 646, 747].

Стадия бластоцисты характеризуется началом тотального метилирования ДНК зародыша *de novo*. Предположительно, метилирование происходит в период от 5,5 до 6,5 дней развития мыши, то есть вскоре после имплантации. К 6,5 дням все однокопийные гены, не имеющие CpG-островков, уже метилированы. В то же время гены, содержащие CpG-островки, гомеобоксные гены и активные аллели импринтированных генов метилируются *de novo* на более поздних стадиях развития. Как уже упоминалось, первичные половые клетки, т. е. клетки будущих дефинитивных гамет, избегают метилирования *de novo* вплоть до момента заселения гонад (у мышей — 11,5 дней развития). Метилирование в этих клетках происходит только после 14-го дня развития [747].

Аллель-специфический паттерн метилирования, установленный еще в эмбриональный период, сохраняется и в соматических клетках взрослых индивидов. Так, в культивируемых фибробластах функционирует только отцовская аллель гена *Igf2*, тогда как материнская аллель этого гена экспрессируется только при добавлении в культуру клеток ингибитора метилтрансферазы — 5-азадеоксицитидина [212].

Изменения эпигенотипа, приводящие к ослаблению или нарушению установившегося импринтинга, способствуют развитию патологических состояний клетки, в частности, ее злокачественному перерождению. В этой связи особый интерес представляет изучение молекулярных механизмов установления и поддержания аллель-специфического метилирования.

В настоящее время предполагается существование, по крайней мере, двух механизмов узнавания импринтированных участков генома.

Согласно одному из них, прямые тандемные повторы, находящиеся в CG-обогащенных последовательностях и ассоциированные с районами дифференциального метилирования, могут являться молекулярными маркерами импринтированных генов [665]. Действительно, при изучении первичной структуры импринтированных генов было установлено, что большинство из них содержат в своих регуляторных областях прямые тандемные повторы. Сравнительный анализ таких повторов не выявил высокой гомологии их последовательностей. Однако высокое содержание гуанина, сходная протяженность и характерная локализация по отношению к кодирующей части гена позволили предположить, что эти последовательности могут исполнять роль молекулярных маркеров импринтированных генов. По-видимому, такие повторы могут формировать альтернативные вторичные шпильчатые структуры ДНК или специфичные хроматиновые домены, которые, в свою очередь, могут маркировать участки, в которых будет происходить метилирование *de novo* в гаметях или в клетках зародыша [327].

Согласно второму механизму, важная роль в аллель-специфичной экспрессии генов принадлежит транскриптам импринтированных аллелей. Рассмотрим этот механизм на примере одного из трех генов, для которых доказано существование антисмысловых транскриптов. Так, для материнской аллели гена *Igf2r* у мыши показан синтез антисмыслового транскрипта, функция которого заключается в подавлении экспрессии отцовской аллели этого же гена, результатом чего становится моноаллельная экспрессия материнского гена [500]. Мутации, нарушающие синтез такого антисмыслового РНК-транскрипта, приводят к экспрессии отцовского гена *Igf2r* [569].

10.2.2. Инактивация X-хромосомы

Ярким примером регуляции активности генов, ключевым звеном которой является нетранслируемый транскрипт, является инактивация X-хромосомы в соматических клетках самок млекопитающих.

Процесс инактивации начинается на определенном участке, так называемом «центре инактивации X-хромосомы», в котором картирован ген *Xist* (X-инактивирующий специфический транскрипт). Ген *Xist* имеет три промотора — P0, P1 и P2. Если транскрипция осуществляется с промоторов P1 и P2, то образуется стабильный транскрипт размером 15 000 п. о., если с промотора P0 — возникает нестабильный продукт.

Переключение транскрипции с промотора P0 на P1/P2 коррелирует с началом процесса инактивации X-хромосомы [755]. Накопление специфических стабильных РНК-транскриптов по длине X-хромосомы ведет к образованию так называемой «РНКовой шубы», которая постепенно покрывает всю X-хромосому и детерминирует ее инактивацию. В функционально активной X-хромосоме ген *Xist* инактивирован. Супрессия гена *Xist* определяется метилированием CpG-динуклеотидов в последовательности 5'-GCGCCGCGG-3' (от -44 до -36), расположенной в промоторной области гена *Xist* [447]. Наличие или отсутствие метилирования этого участка определяет активность гена *Xist* на доимплантационной стадии развития. Показано, что после обработки культивируемых клеток 5-азациитидином происходит частичная реактивация генов X-хромосомы, что свидетельствует о значимой роли метилирования в создании и поддержании инактивированного состояния X-хромосомы [645, 778]. У эмбрионов мыши в доимплантационный период (3,5–4-й день развития) в трофэктодерме и в первичной энтодерме наблюдается импринтированная экспрессия гена *Xist*, причем инактивируется преимущественно отцовская аллель. Для тканей самого зародыша характерна случайная инактивация X-хромосомы [418].

10.2.3. Болезни, обусловленные нарушениями метилирования

Выше уже упоминалось о двух сравнительно частых моногенных заболеваниях (ICF-синдром и синдром Ретта), которые обусловлены мутациями в генах метилтрансфераз. На сегодняшний день имеются сведения более чем о 30 заболеваниях, основой которых являются нарушения метилирования ДНК, приводящие к аномалиям процесса импринтинга и, как следствие, к «болезням импринтинга» [120, 121, 128]. В основу классификации болезней импринтинга может быть положен уровень организации генетического материала (геном, хромосомы, гены), на котором проявляется эффект геномного импринтинга [120]. Нарушения на уровне целого генома приводят к развитию хорионэпителиомы — злокачественной опухоли, возникающей при беременности из клеток трофобласта при наличии в них только отцовского генома и утрате генома ооцита, т. е. являющихся продуктом диспермного оплодотворения (андрогенеза). Нарушения на хромосомном уровне, обусловленные полной или частичной однопородительской дисомией

хромосом или их сегментов, содержащих импринтированные гены, могут осложнять течение беременности (плацентарная недостаточность) или проявляться после рождения (хромосомные болезни) [403, 532]. Импринтированные гены обнаружены на многих хромосомах человека — 1, 5, 6, 11, 14, 15, 19, 20, X. Два больших кластера импринтированных генов локализованы на хромосомах 11 и 15. Патологический эффект импринтинга, связанный с однородительской дисомией, описан для хромосом 1, 2, 4–11, 13–16, 19, 20, 22 и X. На геномном уровне наиболее яркими примерами являются синдром Прадера–Вилли и синдром Ангельмана, обусловленные мутациями, либо нарушениями функций в кластере импринтированных генов в проксимальной части длинного плеча хромосомы 15. Предположительно с феноменом геномного импринтинга связывают особенности наследования таких частых заболеваний как маниакально-депрессивный психоз, хорея Гентингтона, шизофрения, аутизм, миотоническая дистрофия.

10.2.4. Роль метилирования в онкогенезе

Сохранение паттерна метилирования ДНК, характерного для каждого типа клеток, важно для обеспечения их нормальной жизнедеятельности и функции. Вместе с тем, в настоящее время накапливается все больше фактов, что его нарушение может играть существенную роль в процессах трансформации нормальных клеток в опухолевые. Изменения статуса метилирования широко распространены при спорадических раковых заболеваниях человека, характеризующихся гипометилированием на уровне генома и локальным абберантным гиперметилированием CpG-островков [861]. При этом оба процесса, одновременно происходящие в разных районах генома, могут предшествовать озлокачествлению [334]. Важная роль в онкогенезе принадлежит спонтанному дезаминированию 5-метилцитозина в определенных районах генов, которое приводит к точковым мутациям — заменам С на Т (рис. 10.10). 24% мутаций в гене опухолевого супрессора белка p53 составляют замены С→Т в динуклеотидах CpG, что является одной из причин, детерминирующих образование солидных опухолей [658, 836]. Известно, что в гене p53 содержится около 290 CpG-динуклеотидов. При этом точковые замены в 23 CpG-динуклеотидах, расположенных в районе, кодирующем ДНК-связывающий домен, составляют треть от общего числа мутаций в этом гене [560]. Установлена опре-

деленная зависимость между расположением «горячих точек» мутаций и локализацией опухоли. Так, в гене p53 мутационные изменения в кодонах 175, 248, 273 характерны только для опухолей молочной железы, яичника и для лейкемии [798], а в кодоне 157 — лишь для опухолей легкого у курящих пациентов [709].

Существует три гипотезы, объясняющие роль гипометилирования в индукции злокачественных образований — активация протоонкогенов, хромосомная нестабильность и активация латентных ретротранспозонов [836]. При этом уровень озлокачествления в определенной мере коррелирует со степенью метилирования геномной ДНК [776, 795].

Важную роль в опухолевой трансформации нормальных клеток может играть и процесс гиперметилирования, в особенности, если он затрагивает промоторные области генов онкосупрессоров (рис. 10.10). Ген ретинобластомы pRb был первым из множества генов, для которых была доказана взаимосвязь между гиперметилированием их промоторов и инактивацией транскрипции [435]. Такой же механизм регуляции характерен и для генов, контролирующих клеточный цикл, дифференцировку, апоптоз, репарацию ДНК, устойчивость к наркотическим веществам, детоксикацию и т. д. [108]. Нередко гиперметилирование промоторной области генов коррелирует с увеличением уровня актив-

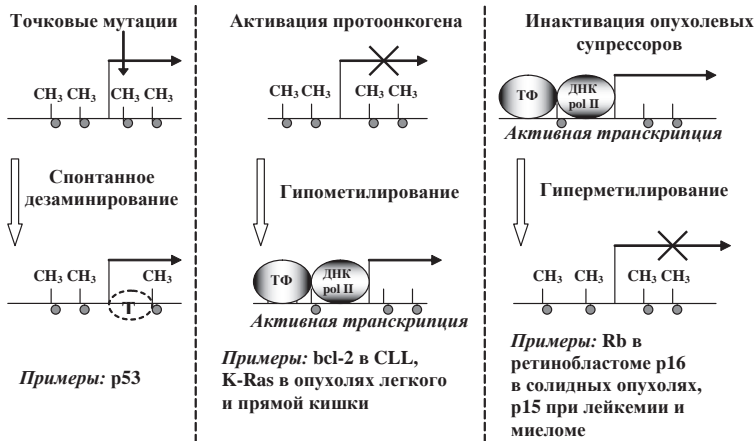


Рис. 10.10. Предполагаемое значение спонтанного дезаминирования 5-метилцитозина, гипометилирования и гиперметилирования в онкогенезе [792]

ности ДНК-метилтрансфераз, что ведет к стабильному выключению функций онкосупрессоров, а также генов, контролирующих клеточную пролиферацию или апоптоз [539].

Сегодня не вызывает сомнения, что изменение статуса метилирования может предшествовать началу опухолевой трансформации нормальных клеток при многих раковых заболеваниях. Считается, что дефекты метилирования, обусловленные действием различных эндогенных и экзогенных факторов в сочетании с предсуществующими мутациями онкогенов и онкосупрессоров, создают, согласно известной «двухударной гипотезе» [546], необходимые условия для бласт-трансформации и злокачественного роста [72]. Открытие этих механизмов послужило толчком для разработки многочисленных генетических тестов ранней диагностики, лечения и прогнозирования онкологических заболеваний на основе изучения статуса метилирования многих генов.

Важно отметить, что столь существенные в процессах онкогенеза гены, контролирующие клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, являются, по сути, «эмбриональными» генами, т. е. генами, ответственными за раннее эмбриональное развитие.

10.2.5. Статус метилирования хромосом в эмбриогенезе человека

Согласно многочисленным исследованиям на зародышах млекопитающих метилирование ДНК представляет собой универсальный и, по видимому, основной метод регуляции активности генов в развитии. При этом для нормального развития необходимо соблюдение исторически сложившегося порядка метилирования и деметилирования генома. Как уже упоминалось (см. раздел 10.2.1), характерный для родительских гамет паттерн метилирования ДНК полностью стирается на начальных этапах дробления, на стадиях морулы — ранней бластоцисты происходит тотальное неспецифичное метилирование ДНК, после чего по мере дифференцировки в каждом клеточном клоне (линии) устанавливается новый, специфичный для него паттерн метилирования. Следовательно, по мере дифференцировки клеток и формирования зародышевых листков все более активными становятся процессы специфического деметилирования индивидуальных генов и целых хромосомных доменов [84].

Логично предполагать, что, исследуя паттерны метилирования ДНК на разных стадиях, можно получить ценную информацию о порядке

реализации наследственной программы в процессах индивидуального развития зародыша, то есть приблизиться к пониманию функций генома в эмбриогенезе.

Для решения этой проблемы были разработаны специальные методы, позволяющие визуализировать непосредственно на цитологических препаратах активно работающие гены, точнее кластеры этих генов, сосредоточенные в определенных участках хромосом. К ним относятся методы рестрикции *in situ*, методы ник-трансляции *in situ* и другие молекулярные методы, ранее применявшиеся только в экспериментах с изолированной ДНК. Некоторые из них ранее с успехом были применены для изучения особенностей структурно-функциональной организации хромосом в эмбриогенезе лабораторных млекопитающих [143]. В серии наших исследований впервые был проведен анализ особенностей метилирования ДНК хромосом в разных тканях и на разных стадиях эмбриогенеза человека [125, 135, 145, 558].

10.3. Анализ статуса метилирования хромосом с помощью метода ник-трансляции *in situ*

Известно, что активный хроматин, где находятся работающие и, следовательно, деметилированные гены, чувствителен к рестрикции ферментом ДНКазой I [501]. Показано, что основное количество гиперчувствительных к ДНКазе I сайтов (ДН-сайтов) локализовано в 5'-концах тканеспецифичных генов, где располагаются регуляторные последовательности, включая CpG-островки [555]. Специфическая конформация хроматина, определяющая чувствительность активных или потенциально активных генов к ДНКазе I, сохраняется и в фиксированных митотических хромосомах, что впервые было продемонстрировано на примере различий в чувствительности к ДНКазе I активной и инактивированной X-хромосом [501]. При обработке *in situ* препаратов метафазных хромосом ДНКазой I в местах скопления активных генов в цепочке ДНК образуются бреши (ники), которые затем в присутствии ДНК-полимеразы I и набора меченых нуклеотидов, репарируются и могут быть визуализированы. Распределение ник-трансляционного сигнала по длине метафазных хромосом (D-рисунок) в целом совпадает с типичным рисунком R-дисков метафазных хромосом [593].

Следует отметить, что метод ник-трансляции *in situ* без предварительных обработок нуклеазами позволяет выявить на метафазных хро-

мосомах спонтанные однонитевые разрывы в ДНК. Так, множественные однонитевые разрывы были обнаружены в хромосомах мышей на доимплантационных стадиях эмбриогенеза [697], а также в различных клетках при апоптозе [329, 906].

Попытки использования специфических эндонуклеаз рестрикции в цитогенетической практике, предпринятые в 1980–1990-е годы [875], оказались вполне успешными для изучения нуклеотидного состава ДНК в различных участках хромосом. Так, рестриктазы, имеющие сайты-мишени, обогащенные С- и G-нуклеотидами, индуцируют, в основном, G-подобный рисунок [623], а рестриктазы, сайты-мишени которых обогащены А- и Т-основаниями — R-подобный рисунок [877]. Однако ДНК не во всех участках хромосомы равно доступна для действия рестриктаз [841]. На рестрикцию *in situ* влияют как структура ферментов, так и структура хроматина [367]. Некоторые рестриктазы (например, TaqI), сайты-мишени которых локализованы преимущественно в сателлитной ДНК, могут экстрагировать ДНК из таких очень компактизованных районов как С-блоки в хромосомах 1, 9, 16 и Y [330, 581]. Другие рестриктазы, например, AluI, наоборот, особенно интенсивно экстрагируют ДНК из плеч хромосом, индуцируя С-рисунок [397].

В плане локализации функционально активных участков хромосом особый интерес представляют эндонуклеазы, обладающие различной чувствительностью к сайтам ДНК в зависимости от того, являются ли те метилированными (неактивными) или неметилированными (активными).

Так, эндонуклеазы MspI и HpaII расщепляют один и тот же сайт ДНК — C↓CGG, то есть являются изошизомерами. Метилирование этого сайта не влияет на рестрикционные свойства эндонуклеазы MspI, тогда как эндонуклеаза HpaII расщепляет этот сайт только в том случае, если внутренний цитозин неметилирован. С помощью именно этих рестриктаз на изолированной ДНК человека было показано, что число неметилированных CCGG-сайтов примерно в 4 раза меньше, чем всех CCGG-сайтов [523].

Доступность сайтов-мишеней для рестриктаз, особенно HpaII, осложняется вследствие связывания ДНК с белками, в том числе с метилцитозин-специфическими белками [214], а также наличием в R-дисках Alu-повторов с высоким содержанием метилированных CpG-динук-

леотидов [809]. Однако именно эти сайты, будучи в составе активного хроматина, подвергаются рестрикции HpaII и MspI, что позволяет после проведения ник-трансляции регистрировать образованные ими бреши в виде дифференциальной исчерченности метафазных хромосом. Поскольку наибольшее количество сайтов-мишеней для этих рестриктаз находится в CpG-островках генов «домашнего хозяйства», которые локализованы в R-дисках [336], то ник-трансляция с использованием рестриктаз MspI или HpaII на хромосомах лимфоцитов человека позволяет получить дифференциальную исчерченность, подобную R-рисунку [214, 851]. Различная доступность этих сайтов для HpaII и MspI, обусловленная статусом их метилирования, определяет разное число разрывов, вносимых этими рестриктазами, в одних и тех же участках метафазных хромосом. Сопоставление этих различий позволяет судить о степени метилирования отдельных участков хромосом.

Таким образом, метод ник-трансляции *in situ* с использованием различных эндонуклеаз открывает широкие возможности для изучения структурной и функциональной организации хромосом млекопитающих и человека.

В нашей работе впервые использован этот метод для изучения распределения активных и потенциально активных участков хромосом на препаратах из спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта, а также из эмбриональных тканей (эпителий кишечника, почки, легкие, роговица глаза и др.), полученных при медицинских абортах в срок 5–12 недель развития.

Согласно литературным данным, на препаратах хромосом культивированных лимфоцитов человека после ник-трансляции с использованием рестриктаз HpaII и MspI [214, 851] или следовых количеств ДНКазы I [501, 593], сигнал регистрируется преимущественно в R-дисках и в активной X-хромосоме. Ориентируясь на эти данные, ключевыми моментами при адаптации метода ник-трансляции для анализа «прямых» препаратов было создание оптимальных условий для получения специфического сигнала в R-дисках на аутосомах и в длинных плечах X-хромосом.

При подборе методических условий нами была апробирована амплификация ник-трансляционного сигнала методом «иммунных сэндвичей» [713], 1–2 раунда которой позволили значительно повысить эффективность выявления сегментации. Этот метод достаточно попу-

лярен при проведении FISH, однако для детекции сигнала при ник-трансляции он был применен нами впервые.

Оптимальные условия предобработок препаратов, проведения реакции ник-трансляции, опосредованной ДНКазой I и эндонуклеазами рестрикции HpaII и MspI приведены в Приложении.

10.3.1. Общая характеристика функционального статуса хромосом у эмбрионов человека

При любых предобработках препаратов (ДНКазой I, MspI и HpaII) флуоресцентный ник-трансляционный сигнал регистрировался во всех хромосомах, однако его интенсивность и характер распределения по сегментам различных хромосом и в клетках различного эмбрионального происхождения оказались различными.

На препаратах из эмбриональных тканей при обработке ДНКазой I распределение сигнала было столь диффузным, что не позволяло отнести его к какому-либо определенному типу сегментации (рис. 10.11)*. Предобработки с помощью MspI и HpaII индуцировали более четкий рисунок, соответствующий R-исчерченности (рис. 10.12)*. Следует отметить полное отсутствие ник-трансляционного сигнала в C-сегментах и единичные сигналы в районах 1qh, 9qh, 16qh хромосом из эмбриональных клеток при различных предобработках препаратов.

В клетках цитотрофобласта предобработка ДНКазой I приводила к диффузному распределению сигнала по хромосомам с преобладанием в R- и особенно в T-сегментах и прицентромерных гетерохроматиновых районах хромосом 1, 9, 16, 15 и 22 (рис. 10.13)*, в то время как воздействие MspI и HpaII — к более четкой картине R+T-исчерченности при сохранении сигнала в районах 1qh, 9qh, 16qh, 15cenh и 22cenh (рис. 10.14)*.

Обнаруженные межтканевые различия, обусловленные спецификой использованных ферментов и их различным сродством к сайтам-мишеням, отражают более глубинные различия в структурно-функциональной организации хромосом клеток эмбриона и его провизорных органов. Так, известно, что ДНК трофобласта в меньшей степени метилирована по сравнению с ДНК внутренней клеточной массы [646], а уровень метилирования CpG-динуклеотидов в плаценте почти в 2 раза ниже, чем в лимфоцитах взрослого человека [369]. Кроме того,

* Рисунок на цв. вкл.

замещение цитозина на 5-метилцитозин в значительной мере влияет на структуру и стабильность хроматина и сопровождается его деконденсацией [899]. Это явление можно оценить визуально. Так, при одинаковых методических условиях приготовления «прямых» препаратов метафазные хромосомы из клеток цитотрофобласта хориона заметно менее конденсированы по сравнению с хромосомами из эмбриональных клеток — производных внутренней клеточной массы (ср. метафазные пластинки, видеоизображения которых получены при одном увеличении, рис. 10.11 и 10.13)*. Поэтому логично, что ДНК хромосом в цитотрофобласте более доступна для нуклеаз, чем в клетках эмбрионального происхождения. Что касается неспецифического проявления сигнала, затрудняющего определение границ сегментов на хромосомах, то следует отметить, что в процессе ник-трансляции происходит репарация любых разрывов, индуцированных не только тем или иным ферментом, но и условиями приготовления препаратов. Не исключено, однако, что спонтанные однонитевые разрывы в ДНК являются свойством метафазных хромосом эмбриональных клеток. По крайней мере, множественные однонитевые разрывы обнаружены в хромосомах мышей на доимплантационных стадиях развития [697].

В какой-то мере нечеткость сегментации обусловлена и различной плотностью распределения сайтов-мишеней для эндонуклеаз, которая определяется как их распределением в первичной последовательности ДНК, так и особенностью их упаковки в процессе спирализации хромосомы.

Уместно напомнить, что специфичность распределения АТ- и СG-пар оснований ДНК в геноме хорошо коррелирует с особенностями R/G дифференциальной окраски метафазных хромосом. Так, для G-дисков характерна высокая плотность АТ-пар, тогда как R-диски богаты GC-динуклеотидами. При этом R-сегменты неоднородны и подразделяются на несколько подтипов в зависимости от распределения и плотности GC-богатых фрагментов (изохоров), а также содержания других молекулярных маркеров, например, Alu-повторов [772]. При этом наиболее GC-богатые R-сегменты, независимо от содержания в них Alu-повторов, определяют как T-сегменты [473]. Важно отметить, что плотность генов в GC-обогащенных R-сегментах, особенно в T-сегментах, которые относятся к активно транскрибируемому хроматину, в среднем на порядок выше, чем в АТ-богатых G-дисках [161, 258, 820].

* Рисунок на цв. вкл.

Результаты проведенного нами анализа распределения ник-трансляционных сигналов по плечам хромосом наглядно иллюстрируют факты локализации в R- и T-сегментах GC-богатых последовательностей (по расположению сайтов-мишеней для рестриктаз MspI и HpaII) и принадлежности к активному хроматину (по различной доступности для рестриктаз MspI и HpaII, обусловленной метилированием и наличием сайтов-мишеней для ДНКазы I). Так, максимальная концентрация сигнала при одном раунде амплификации регистрировалась в T-сегментах, например, в хромосоме 7 в сегментах 7q32 и 7q36 (рис. 10.14)*, в хромосоме 11 — в сегментах 11p15, 11q23 и особенно — в 11q13 (рис. 10.15)*. Интересно отметить, что район 11q12–13 является «горячей точкой» рекомбинации [355]. Оба плеча хромосомы 19, в которой все R-блоки являются, по сути, T-блоками, демонстрировали наличие сигнала, тогда как хромосома 18, которая не имеет T-блоков, демонстрировала относительно слабое свечение. Исключениями являлись некоторые R-блоки (например, 18p11, 18q23, 9q22), интенсивность включения сигнала в которые была сопоставима с истинными T-блоками (рис. 10.13 и 10.14)*. По-видимому, в большинстве R-сегментов плотность CpG-островков недостаточна для выявления сигнала на цитологическом уровне, хотя проявление многих R-сегментов после 2-кратной амплификации сигнала свидетельствует о том, что образование и репарация брешей («ников») происходит и в них, но с меньшей интенсивностью.

При анализе распределения участков хромосом, чувствительных к нуклеотид-специфичным эндонуклеазам, необходимо учитывать степень спирализации хромосом. Известно, что многие R- и G-сегменты на малоспирализованных хромосомах «распадаются» на субсегменты, число и относительная плотность которых варьируют в разных районах хромосом (см. главу 2). При спирализации слияние одних субсегментов в сегменты и далее в районы хромосом происходит более, других — менее интенсивно [162, 168, 176]. Эти особенности неравномерной упаковки имеют немаловажное значение при характеристике структурно-функциональных особенностей конкретных участков хромосомы.

Расшифровка генома человека и очевидные успехи в картировании генов на хромосомах предоставляют уникальную возможность

* Рисунок на цв. вкл.

проанализировать особенности генного состава участков хромосом, характеризующихся, согласно полученным данным, выраженным сигналом ник-трансляции, который соответствует активному состоянию гетерохроматина. Сравнительный анализ таких функционально активных сегментов в клетках цитотрофобласта (см. выше) указывает на то, что именно в них сосредоточены кластеры генов факторов транскрипции (PAX4, HRC1, HRAS1, SOX6, ZNF214, ZNF215, ZNF143, ZNF195, HLXB9), факторы роста (INS, IGF2, INSIG1), гены энергетического обмена (сDKNIC, NDUFA5), гены регуляторы митотической активности (RAS, REHEB2, p53, H19), гены клеточной дифференцировки, в том числе, участвующие в развитии плаценты (H19, KIP2RNH) и эмбриональной дифференцировке (SCRA1, PTJP, GBX1, MEST, SHH), а также гены малых цитоплазматических РНК (RNY1–5). Участие этих генов в контроле процессов раннего эмбриогенеза, в том числе в развитии и становлении хориона и дефинитивной плаценты представляется вполне реальным. Таким образом, с определенными ограничениями, результаты, полученные методом ник-трансляции, вполне могут быть использованы для поиска участков хромосом, обогащенных генами, активно функционирующими в определенных клетках на соответствующих стадиях развития. Мы еще вернемся к рассмотрению этого принципиально важного положения в заключительной главе.

Характер распределения ник-трансляционных сигналов в метафазных пластинках из клеток цитотрофобласта принципиально не отличался между гомологичными хромосомами. Вместе с тем, идентичные районы некоторых гомологичных хромосом проявляли заметные отличия по интенсивности флуоресценции. Учитывая, что эти отличия могут отражать различную функциональную значимость гомологичных хромосом в эмбриогенезе [380], представляло интерес понять причину этой гетерогенности.

Сравнительный анализ гомологичных хромосом по интенсивности ник-трансляционного сигнала был предпринят на «прямых» препаратах из клеток цитотрофобласта хориона от 9 эмбрионов 8–11 недель развития. От каждого индивида исследовали по 4 метафазные пластинки с четкой R+T-сегментацией хромосом, полученной при обработке препаратов ДНКазой I и HpaII. При визуальной оценке интенсивности сигнала в идентичных районах хромосом заметные различия регистрировали как «+», а их отсутствие — как «-». В качестве приме-

Таблица 10.3. Сравнительный анализ различий по интенсивности флуоресцентного сигнала в интервале 2q11 ~ q13 на метафазных хромосомах из клеток цитотрофобласта после ник-трансляции с обработкой ДНКазой I

№ эмбриона	Срок развития (недель)	Кариотип плода	Различия в интенсивности ник-трансляционного сигнала					
			Метафазные пластинки				Всего	
			1	2	3	4	+	-
1	7	46,XX	+	+	+	+	4	0
2	8	46,XX	+	+	+	+	4	0
3	8	46,XX	+	+	+	-	3	1
4	8	46,XY	+	+	+	+	4	0
5	9	46,XY	+	+	+	-	3	1
6	10	46,XY	+	+	+	+	4	0
7	11	46,XX	+	+	+	-	3	1
8	11	46,XX	+	+	-	-	2	2
9	11	46,XY	+	+	+	-	3	1

ра приведен принцип оценки различий в районе 2q11–q13 (табл. 10.3). После проверки на однородность выборки с помощью таблиц сопряженности достоверность различий/сходства оценивали методом χ^2 . Результаты сравнительного анализа по нескольким сегментам хромосом суммированы на рисунке 10.16. В большинстве случаев межклеточные различия имели случайный характер и, по-видимому, были связаны с погрешностями методик и визуальной оценки интенсивности флуоресценции (качеством препаратов, нестрогим соблюдением условий обработки ферментами и проведения реакции ник-трансляции, наличием неспецифических сигналов и т. д.). Межиндивидуальные различия по некоторым сегментам, возможно, были обусловлены различиями в сроках развития эмбрионов, однако проверка этого предположения требует увеличения выборки.

Различия по интенсивности ник-трансляционного сигнала подтвердились лишь по сегментам хромосом X и 2. Наиболее ярко они были представлены в интервале Xq24–q27. Во всех метафазных пластинках на препаратах хориона плодов с кариотипом 46,XX были отмечены различия между X-хромосомами в интенсивности флуоресценции ник-сигнала как после обработки ДНКазой I, так и HpaII (рис. 10.16). Следует отметить, что в работах других авторов различия между

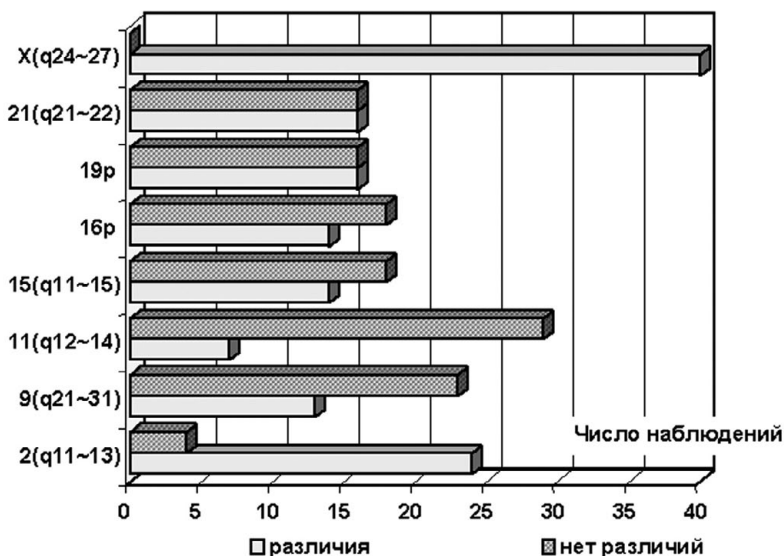


Рис. 10.16. Результаты сравнительного анализа интенсивности флуоресценции нуклеотрансляционного сигнала между участками гомологичных хромосом в клетках цитотрофобласта с предобработкой ДНКазой I

X-хромосомами на хромосомных препаратах из культивированных лимфоцитов были зарегистрированы только при изотопном варианте нуклеотрансляции [501], и не были обнаружены при детекции в проходящем свете [214, 851]. С помощью модифицированного варианта метода нуклеотрансляции *in situ* (метод SPRINS) были обнаружены различия в метилировании по большому числу сегментов активной и неактивной X-хромосом в 57–90% лимфоцитов от разных доноров с нормальным женским кариотипом [229]. Принимая во внимание, что район Xq24–q27 подвергается инактивации только на одной из X-хромосом, различия в метилировании ДНК и конформации хроматина в этих участках свидетельствуют об отличиях их функционального статуса. Вместе с тем, корреляция между метилированием и активностью X-хромосом оказывается более сложной. Так, при анализе лимфобластной клеточной линии, характеризующейся полисомией X-хромосом, методом SPRINS было установлено, что активная X-хромосома гиперметилирована по сравнению с неактивными X-хромосомами [229]. Возможно, эти различия обусловлены наличием особого механизма выключения неактивной X-хромосомы

(см. раздел 10.2.2). Таким образом, метод флуоресцентной детекции достаточно чувствителен для выявления различий между X-хромосомами в клетках с двумя и более X-хромосомами, а также пригоден для анализа функциональных различий отдельных районов гомологичных аутосом.

Достоверные различия в интенсивности флуоресценции ник-трансляционного сигнала между аутосомными гомологами были зарегистрированы только по хромосоме 2 (район 2q11–q13). В остальных хромосомах, независимо от использованных эндонуклеаз (ДНКаза I или HpaII), различия в гомологичных районах и их отсутствие регистрировались примерно с одинаковой частотой (рис. 10.16). Можно предполагать, что район 2q11–q13, содержащий 2 R-сегмента (2q11.2 и 2q11.3) и характеризующийся высокой плотностью генов [473], функционально активен только в одной из гомологичных хромосом в клетках цитотрофобласта. Тожественный район в другом гомологе, по-видимому, остается функционально инертным. К сожалению, пока неясно, является ли функционально активным (или инертным) район 2q11–q13 одного и того же гомолога и если так, то каково родительское происхождение этой хромосомы.

Принимая во внимание известные факты неслучайной инактивации отцовской X-хромосомы в провизорных органах (плацента, желточный мешок) мышей и, возможно, человека [588], особенности плаценты и оболочек как основного иммунологического барьера между генетически различными организмами [694], предположение о функциональной неравнозначности генов района 2q11–13 представляется вполне логичным. Однако этот феномен нуждается в дополнительных доказательствах.

Между тем, функциональная гетерогенность гомологов, доказанная для X-хромосомы и предполагаемая, согласно полученным результатам, для района 2q11–q13, по всей видимости, носит более универсальный характер и не ограничена цитотрофобластом. Об этом, в частности, свидетельствуют данные о различиях между гомологами хромосом 11 и 15 по интенсивности ник-трансляционного сигнала, опосредованно обработкой HpaII [145]. Отличия гомологов по локусу 15q11–q13 наблюдались только в эмбриональных клетках (рис. 10.17)*, но не в клетках цитотрофобласта. Известно, что локус 15q11–q13 содержит кластер из 10 импринтированных генов, экспрессия 9 из которых осуществляется с отцовской аллели и лишь одного — с материнской [721]. Нарушение импринтирования генов этого локуса, его делеция

* Рисунок на цв. вкл.

или однородительская дисомия приводят к возникновению синдромов Прадера–Вилли или Ангельмана, в зависимости от того, в какой из родительских хромосом произошли изменения, или какая из хромосом представлена в двух копиях [710]. С учетом того, что только в зародышевых клетках наблюдались различия между гомологами хромосом 15, т. е. локус 15q11–q13 в одном из гомологов был гипометилирован, можно предполагать, что активное состояние сохраняют гены в этой области только на одной хромосоме, тогда как в другом гомологе они гиперметилированы и, по-видимому, функционально неактивны. Импринтирование этого локуса свойственно только эмбриональным клеткам, но не цитотрофобласту, по крайней мере, в 5–8 недель развития.

Различия между гомологами по характеру включения сигнала наблюдались также по участку 11p15 (рис. 10.18)*. Так, в клетках экстраэмбриональных тканей гипометилированный локус находился лишь на одном из гомологов, в то время как в эмбриональных клетках этот участок оказался гипометилированным на обоих гомологах. Следовательно, локус 11p15, возможно, импринтирован только в клетках внезародышевых тканей. Интересно отметить, что этот локус хромосомы 11 содержит кластер из семи импринтированных генов, для шести из которых характерна экспрессия материнских аллелей и для одного — отцовской [721].

10.3.2. Характеристика прицентромерных районов и коротких плеч акроцентрических хромосом

Интенсивный сигнал ник-трансляции наблюдался и в коротких плечах всех акроцентрических хромосом. При этом отмечались существенные различия по интенсивности сигналов между гомологами (рис. 10.13, 10.14)*, что, вероятно, связано с разным числом транскрибируемых копий *r*-генов в ЯОР и особенностями ДНК, входящей в состав прицентромерного гетерохроматина и спутников. Следует отметить, что интенсивность сигнала в районах спутничного гетерохроматина была заметно ниже, чем в районах спутничных нитей (рис. 10.13, 10.14)*. В целом, наши наблюдения подтверждают наличие хромосомспецифичного полиморфизма сателлитной ДНК в прицентромерном и спутничном гетерохроматине акроцентрических хромосом [229] и согласуются с представлениями о том, что полиморфизм по активности кластеров рибосомных генов определяется степенью метилирования ДНК в этих районах.

* Рисунок на цв. вкл.

Таким образом, выявляемые различия в интенсивности ник-трансляционного сигнала действительно отражают различия в функциональном статусе сегментов хромосом, ранее установленные молекулярными методами.

10.3.3. Особенности функционального состояния районов прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16

Как упоминалось выше, при любых предобработках препаратов перед проведением ник-трансляции, наряду с сегментацией, соответствующей стандартной R/T-исчерченности, яркий флуоресцентный сигнал определялся в районах прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в клетках цитотрофобласта и практически отсутствовал в клетках эмбриональных тканей (рис. 10.19)*. В аналогичных работах, выполненных на лимфоцитах периферической крови в постнатальном периоде, а также на клетках лимфобластоидной линии ник-трансляционного сигнала в блоках конститутивного гетерохроматина не наблюдалось [214, 851].

Наличие в прицентромерном гетерохроматине ник-трансляционного сигнала, опосредованного метилчувствительной рестриктазой HpaII, свидетельствует о том, что районы конститутивного гетерохроматина 1qh, 16qh и, в особенности, 9qh гипометилированы в цитотрофобласте по сравнению с эмбриональными тканями. Гипометилированность ДНК в составе гетерохроматина хромосомы 9 (сегмент 9q12) в плаценте человека и в активно пролиферирующих опухолевых клетках ранее отмечалась в работах других авторов [336, 416]. Феномен гипометилированного состояния гетерохроматина хромосом 1 и 16 в цитотрофобласте хориона зарегистрирован нами впервые [135, 558].

Гипометилированность районов конститутивного гетерохроматина при злокачественных новообразованиях можно считать доказанной. Так, в клетках аденокарциномы молочной железы гипометилированы гетерохроматин хромосомы 1 [494], в лимфобластоидных клетках и клетках опухолей Вильмса гипометилированы районы 1q12 и 16q11 [491, 776]. Известно также, что хорион человека, состоящий из трофобласта, внезародышевой эктодермы и внезародышевой мезодермы, представляет собой активно пролиферирующую и бурно дифференцирующуюся ткань (см. главу 1). Пролиферация и дифференцировка осо-

* Рисунок на цв. вкл.

бенно интенсивны в цитотрофобласте хориона, который представляет собой камбиальный слой синцитиотрофобласта, обеспечивающий трофику зародыша. Индекс пролиферативного потенциала хориона до 13-й недели развития соответствует таковому для некоторых злокачественных опухолей [734]. Вероятно, механизмы, обеспечивающие интенсивную пролиферацию малигнизированных клеток и нормальных клеток хориона весьма схожи или даже идентичны. Не исключено, что в гетерохроматине локализованы гены пролиферации и клеточного роста, а также факторы их регуляции, активация и инактивация которых осуществляется путем изменения характера метилирования. Предположения о наличии в гетерохроматине эмбриоспецифичных структурных генов, контролирующих ранние стадии эмбриогенеза человека, высказывались и ранее [158, 385]. Однако локализация в гетерохроматине необходимых для раннего развития генетических элементов (ранних генов), активных до начала функционирования эухроматинового генома эмбриона, показана только у дрозофилы [712] и у пашенной полевки [807]. К сожалению, технологии секвенирования, позволившие провести расшифровку 98% генома человека, не позволили установить первичную последовательность нуклеотидов участков ДНК, входящих в состав конститутивного гетерохроматина. Поэтому вопрос о наличии в них структурных генов остается по-прежнему открытым.

Известно, однако, что в состав прицентромерного гетерохроматина, кроме АТ-богатой альфа-сателлитной ДНК, входят три класса сателлитной ДНК, различающихся по насыщенности СG-нуклеотидами и предпочтительному распределению по хромосомам. Так, обогащенные АТ-парами повторяющиеся последовательности сатДНКI преимущественно локализованы в гетерохроматине хромосом 3 и 4, коротких плеч хромосом групп D и G, а также в длинном плече Y-хромосомы. Имеющие и АТ- и СG-пары сатДНКII и III также имеют хромосом-специфичное распределение — сатДНКII в районах 1qh и 16qh, сатДНКIII — в районе 9qh, прицентромерном гетерохроматине коротких плеч акроцентрических хромосом и Y-хромосоме [485, 610]. Известно также, что сатДНКIII хромосомы 9 состоит из пентамеров, 5–15% которых содержат СpG-последовательности [523]. Именно эти сатДНК, в которых могут быть локализованы регуляторные СpG-последовательности структурных генов, и оказываются гипометилированными в экстраэмбриональных тканях. Возможно, экспрессия этих генов необходима для формирования дефинитивной хорион-аллантаидной плаценты.

У двух эмбрионов 6 недель развития после обработки HpaII в цитотрофобласте сигнал был обнаружен в гетерохроматине только в одной из хромосом 1, в то время как после обработки MspI сигнал в 1q12 — зарегистрирован в обеих хромосомах [135]. Следовательно, сайты-мишени CCGG в 1q12 только в одной из гомологичных хромосом находились в деметилированном состоянии, тогда как в другом гомологе этот район был метилирован и, по-видимому, функционально неактивен. На более поздних сроках развития (7–8 недель) при такой же предобработке хромосом сигнал детектировался в районах прицентромерного гетерохроматина обоих гомологов хромосом 1, 9, 16. Можно предполагать, что до 6-й недели развития в клетках хориона функциональную нагрузку несет район 1q12 лишь одного из гомологов, а после 6 недель функционируют обе хромосомы. На этих же сроках беременности, но в эмбриональных тканях прицентромерный гетерохроматин гиперметилирован и, возможно, функционально инертен. Нельзя исключить, что отмеченные различия между гомологами в клетках цитотрофобласта обусловлены разной функциональной значимостью гетерохроматина родительских хромосом в развитии хориона и плаценты. Однако никаких доказательств в пользу этого предположения пока не получено.

10.3.4. Особенности метилирования хромосом при анеуплоидии

Особый интерес представляет метилирование хромосом при анеуплоидии. Паттерн метилирования триады хромосом был изучен нами у двух зародышей с разными трисомиями.

В случае трисомии 16 показанием к прерыванию беременности в срок 6/7 недель явилась анембриония, т. е. отсутствие эмбриона в плодном пузыре. Благодаря гетероморфизму гетерохроматиновых блоков хромосомы 16 удалось установить, что нерасхождение произошло в оогенезе, в первом делении мейоза. После ник-трансляции на препаратах из клеток цитотрофобласта, предобработанных MspI, сигналы были выявлены в районе 16q11 во всех трех гомологах, а после предобработки HpaII — лишь у двух гомологов из триады (рис. 10.20)*. При этом отсутствие ник-трансляционного сигнала зарегистрировано в гетерохроматиновом блоке хромосомы 16 материнского происхождения во всех клетках. У эмбрионов с нормальным кариотипом такого

* Рисунок на цв. вкл.

же срока гетерохроматин хромосомы 16 обоих гомологов характеризовался наличием сигнала. Известно, что трисомия 16 является наиболее частой хромосомной аномалией у ранних спонтанных абортусов (31 % от всех трисомий), особенно при анэмбрионии. При развивающейся беременности она крайне редка и ограничена исключительно цитотрофобластом. Возможно, в первом триместре дисбаланс, обусловленный дополнительной хромосомой 16, частично компенсируется за счет метилирования и инактивации, возможно, «ранних генов», локализованных в прицентромерном гетерохроматине. Этот механизм, однако, оказывается неэффективным на более поздних стадиях. Данное предположение требует, несомненно, более детальных исследований.

Характер метилирования был изучен также в ФГА-стимулированных лимфоцитах пуповинной крови плода 23/24 недель развития с кариотипом 47,XX,+13. По гетероморфизму коротких плеч хромосом 13 было установлено отцовское происхождение дополнительной хромосомы при нерасхождении в первом делении мейоза. При сравнении характера метилирования гомологов хромосомы 13 выявлено различие в районе 13q11, являющемся R-сегментом. Так, на дополнительной хромосоме отцовского происхождения в этом участке хромосомы после обработки HpaII сигнал отсутствовал, т. е. этот сегмент был гиперметилирован, тогда как после обработки MspI было характерно включение меченых нуклеотидов в тождественный район всех трех хромосом (рис. 10.21).

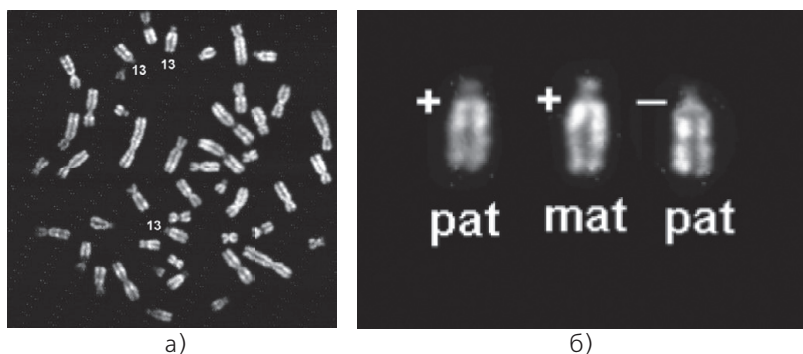


Рис. 10.21. Различия в характере метилирования района 13q11 между гомологичными хромосомами в ФГА-стимулированных лимфоцитах пуповинной крови плода при трисомии 13. Ник-трансляция *in situ* с предобработкой HpaII: а – метафазная пластинка; б – триада хромосом 13. Наличие ник-трансляционного сигнала в районе 13q11 отмечено знаком «+», отсутствие — знаком «-»

Таким образом, в обоих случаях трисомии было зарегистрировано изменение статуса метилирования отдельных локусов на дополнительных хромосомах, что косвенно указывало на их инактивацию. Возможно, таким способом осуществляется реализация некоего «компенсаторного механизма». Безусловно, гипотеза об избирательной компенсации дозы генов на уровне хромосомных сегментов в случае наличия дополнительных хромосом в кариотипе основана пока на единичных фактах. Однако их накопление и детальный анализ, возможно, позволят выяснить механизмы, действующие в несбалансированных кариотипах.

10.4. Анализ особенностей метилирования метафазных хромосом человека с помощью моноклональных антител

Одним из прямых подходов, позволяющих непосредственно регистрировать статус метилирования хромосом, являются опыты с использованием специфических антител к 5-метилцитозину (АТ-МеС). Моноклональные АТ-МеС получены и апробированы на хромосомах млекопитающих в 1974 году. Первые же эксперименты показали перспективность их использования для изучения особенностей метилирования интерфазных ядер и метафазных хромосом человека [307, 368, 632, 717].

Учитывая крайне скудную информацию об особенностях дифференциальной окраски хромосом человека с использованием антител к 5-метилцитозину, на первом этапе нами был исследован статус метилирования хромосом в ФГА-стимулированных лимфоцитах периферической крови у взрослых доноров.

10.4.1. Принцип метода и новый вариант дифференциальной окраски — М-сегментация

Техника иммуноцитохимического окрашивания метафазных пластинок с использованием моноклональных антител к 5-метилцитозину подробно изложена в Приложении. Отметим только, что одним из ключевых этапов в процессе связывания АТ-МеС с участками, содержащими метилированный цитозин, является денатурация хромосомной ДНК. При апробировании двух наиболее распространенных способов денатурации — УФ-облучение и воздействие 2М HCl — в качестве оп-

тимальной была избрана кислотная обработка в течение 25–30 мин, так как она обеспечивала наиболее полную денатурацию хромосом, не изменяя их морфологические характеристики.

Распределение флуоресцентных сигналов по длине хромосом оказалось неравномерным по длине хромосом (рис. 10.22)* и стабильно воспроизводилось во всех проанализированных 72 метафазных пластинках из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови от 7 доноров с нормальным кариотипом. При сравнении М-сегментации и QFH/AcD-исчерченности (рис. 10.23)* установлено, что большинство сайтов связывания АТ-МеС соответствуют R- и T-сегментам. Высокая плотность сайтов связывания антител отмечена также в районах прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 3, 9, 16 и в коротких плечах акроцентрических хромосом групп D и G.

На основе распределения по длине хромосом флуоресцентных сигналов АТ-МеС, имеющих различную интенсивность, визуально оцененную в баллах, были составлены идиограммы (рис. 10.24)*. Интенсивный сигнал (4 балла) был выявлен в большинстве T- и в некоторых R-сегментах, в прицентромерном гетерохроматине хромосом 1, 16 и в коротких плечах больших и малых акроцентриков. Средняя (3 балла) и слабая (2 балла) флуоресценция была характерна для большинства R-, некоторых T-сегментов и для прицентромерного гетерохроматина хромосом 3 и 9. В семнадцати R-сегментах на хромосомах 2, 3, 4, 6, 8, 9, 13, 16 и во всех G-сегментах флуоресцентный сигнал был очень слабым (1 балл), а в центромерных участках отсутствовал (0 баллов) (рис. 10.23, 10.24)*.

Типичная локализация и различия в интенсивности флуоресценции позволили идентифицировать легко узнаваемые маркеры (landmarks) для каждой пары аутосом. В качестве таких M-маркеров были определены районы с интенсивностью флуоресценции 3 и 4 балла. Исключение составил только участок 15q24, флуоресценция которого не превысила 2 балла. Большинство M-маркеров совпадали с T-сегментами, некоторые — с отдельными R- и C-сегментами. Основные характеристики участков аутосом, выделенных в качестве постоянных морфологических маркеров M-сегментации хромосом в лимфоцитах, приведены в таблице 10.4. Специфика M-сегментации половых X- и Y-хромосом не рассматривалась в рамках проведенного исследова-

* Рисунок на цв. вкл.

Таблица 10.4. Характерные морфологические маркеры, выявляемые на метафазных хромосомах человека с помощью специфических моноклональных антител к 5-метилцитозину

Хромосома	Плечо, сегмент	Расположение морфологического маркера	Интенсивность флуоресценции, баллы
1	p36	Дистальный Т-сегмент	4
	q12, q21	Район, объединяющий прицентромерный гетерохроматин и смежный с ним Т-сегмент	4
	q42	Дистальный R-сегмент	4
2	p25	Дистальный R-сегмент	3
	p23	Дистальный R-сегмент	3
	q37	Дистальный Т-сегмент	4
3	p25	Дистальный Т-сегмент	4
	p21	Медиальный Т-сегмент	4
	q21	Проксимальный Т-сегмент	4
	q27	Дистальный R-сегмент	4
	q29	Дистальный R-сегмент	4
4	p16	Дистальный Т-сегмент	4
	q35	Дистальный R-сегмент	4
5	p15	Дистальный Т-сегмент	4
	q31	Дистальный R- и Т-сегмент	3
	q35	Дистальный R- и Т-сегмент	4
6	p23	Дистальный R-сегмент	3
	p21	Медиальный Т-сегмент	3
	q25	Дистальный R-сегмент	4
	q27	Дистальный R-сегмент	4
7	p22	Дистальный Т-сегмент	4
	q11.2	Проксимальный Т-сегмент	4
	q22	Медиальный Т-сегмент	4
	q36	Дистальный Т-сегмент	4

Таблица 10.4 (продолжение)

Хромо- сома	Плечо, сегмент	Расположение морфологического маркера	Интенсивность флуоресценции, баллы
8	p23	Дистальный R-сегмент	4
	p21	Медиальный T-сегмент	4
	q24	Дистальный T-сегмент	4
9	p12	Район прицентромерного гетерохроматина	3
	q34	Дистальный T-сегмент	4
10	p15	Дистальный R-сегмент	4
	p13	Медиальный T-сегмент	4
	q11.2	Проксимальный R-сегмент	3
	q26	Дистальный T-сегмент	4
11	p15	Дистальный T-сегмент	4
	q13	Проксимальный T-сегмент	4
	q23	Дистальный T-сегмент	4
12	p13	Дистальный R-сегмент	4
	q24	Дистальный T-сегмент	4
13	q12	Проксимальный R-сегмент	3
	q32	Дистальный R-сегмент	4
	q34	Дистальный R-сегмент	4
14	q24	Дистальный R- и T-сегмент	3
	q32	Дистальный R- и T-сегмент	4
15	p11.2	Прицентромерный гетерохроматин	4
	q24,	Дистальный R-сегмент	2
	q26	Дистальный R-сегмент	3
16	p13	Дистальный T-сегмент	4
	q11.2	Проксимальный R-сегмент	3
	q24	Дистальный T-сегмент	4

Таблица 10.4 (окончание)

Хромосома	Плечо, сегмент	Расположение морфологического маркера	Интенсивность флуоресценции, баллы
17	p13	Дистальный Т-сегмент	4
	q21	Медиальный Т-сегмент	3
	q25	Дистальный Т-сегмент	4
18	p11.2	Проксимальный R-сегмент	3
	q23	Дистальный R-сегмент	4
19	p13	Т-сегмент	4
	q13	Т-сегмент	4
20	p13	Дистальный R-сегмент	3
	q11.2	Проксимальный Т-сегмент	4
	q13	Дистальный Т-сегмент	4
21	p11.2	Район прицентромерного гетерохроматина	4
	q22	Дистальный Т-сегмент	4
22	p11.2	Район прицентромерного гетерохроматина	4
	q11.2	Проксимальный Т-сегменты	4
	q13		4

ния. Учитывая случайную инактивацию X-хромосомы в соматических клетках, содержащих две и более X-хромосомы, особенности их метилирования являются предметом специального изучения.

Как и в случае ник-трансляции *in situ*, опосредованной чувствительными к метилированию рестриктазами, M-сегменты, выявляемые на метафазных хромосомах с помощью специфических антител, характеризуются выраженными различиями в интенсивности флуоресценции. Последние могут быть обусловлены степенью спирализации хромосом, доступностью сайта-мишени для специфических антител, а также плотностью 5-метилцитозина в соответствующих участках.

Фактор спирализации был минимизирован путем отбора метафазных пластинок со средней степенью спирализации хромосом, соответствующей разрешению ~ 400 сегментов на гаплоидный геном. Условия экспериментов были подобраны таким образом, что хромосомы набора были в равной степени денатурированы по всей длине, что обеспечивало одинаковый доступ антител к сайтам связывания. Таким образом, различия интенсивности флуоресценции в условиях применения специфических антител в наших исследованиях, главным образом, определялись степенью метилирования CpG-динуклеотидов хромосомных сегментов.

Напомним, что R-сегменты имеют ярко выраженную неоднородность нуклеотидного состава и подразделяются на относительно GC-бедные (L1 и L2) и GC-богатые районы (H1, H2 и H3) [229, 772]. H3⁺-районы наиболее обогащены GC-динуклеотидами и соответствуют всем T- и отдельным R-сегментам [772]. Интенсивность флуоресценции AT-MeC в H3⁺-участках варьирует от 2 до 4 баллов, что свидетельствует о различной степени их метилирования (рис. 10.24). При этом большинство сегментов характеризуется интенсивной флуоресценцией (4 балла), в то время как в отдельных H3⁺-сегментах она не превышает 3 баллов. Более того, единичные R-сегменты хромосом 9 и 15, соответствующие H3⁺-участкам (9p13, 9q22, 9q32, 15q15, 15q24), характеризуются слабым флуоресцентным сигналом (2 балла).

Как уже упоминалось, метилированный цитозин, в основном, в виде динуклеотидов CpG, находится в CpG-островках, распределенных в геноме человека неравномерно [326, 869]. В R-сегментах локализовано 80% CpG-островков, расстояние между которыми составляет менее 100 т.п.н., в то время как в G-сегментах расстояние между этими островками превышает 1000 т. п. н. [229, 336]. Согласно нашим наблюдениям, сегменты хромосом, обогащенные CpG-островками, имеют высокий уровень метилирования. Вместе с тем, некоторые сегменты хромосом 6, 9, 10, 13, 15, характеризующиеся высокой плотностью CpG-островков [229], обнаруживают слабый (2 балла — 9p13, 9q22, 10q24, 13q22, 15q24) или даже очень слабый флуоресцентный сигнал (1 балл — 6q15, 6q21, 6q23, 13q22).

Примечательно, что два сегмента хромосомы 9 (9p13, 9q22) и один хромосомы 15 (15q24), характеризующиеся высоким содержанием изохора H3⁺ и CpG-островков, имели низкий уровень флуоресценции

(рис. 10.24)*, что, по всей вероятности, свидетельствовало об их гипометилированном состоянии. Известно, что GC-обогащенность коррелирует с плотностью генов. Последняя может достигать 20-кратной разницы при сравнении разных R-сегментов метафазных хромосом [252, 253, 837, 842, 907]. Можно предполагать, что слабая степень метилирования некоторых участков хромосом, богатых CG-динуклеотидами и характеризующихся наибольшей плотностью генов, свидетельствует об их функциональной активности в исследуемом типе клеток на соответствующей стадии развития. Интересно отметить, что большинство T-сегментов хромосом в клетках цитотрофобласта, которые на основании результатов ник-трансляции, опосредованной HpaII и DNКазойI, были причислены к гипометилированным, оказались гиперметилированными в лимфоцитах периферической крови. Исключение составили сегменты 7q32 и 9q22, которые характеризовались гипометилированным состоянием в обоих типах клеток.

Хромосом-специфичный уровень метилирования был отмечен также для блоков прицентромерного гетерохроматина. Интенсивность флуоресценции гетерохроматина хромосом 1 и 16 на всех проанализированных метафазах была высокой (4 балла) и не зависела от размеров блока. Вместе с тем, для района 9q12 был характерен сигнал меньшей интенсивности (3 балла). Известно, что в геноме человека гетерохроматин большей частью образован сателлитной ДНК I, II, III классов, распределение которых характеризуется определенной хромосом-специфичностью [229, 485]. В состав гетерохроматина хромосомы 9 преимущественно входят сателлиты III и β , более обогащенные CG-динуклеотидами, по сравнению с сатДНК прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1 и 16. Не исключено, что гипометилированное состояние гетерохроматина хромосомы 9 важно для поддержания особой конформационной структуры этого района, необходимой для сохранения функциональной активности.

Отличия в интенсивности флуоресценции AT-MeC наблюдались в коротких плечах акроцентрических хромосом. Как уже обсуждалось выше, причиной этих различий являются полиморфизм сателлитных последовательностей ДНК, входящих в состав прицентромерного гетерохроматина и спутников, и различная активность локализованных в спутничных нитях рибосомных генов.

* Рисунок на цв. вкл.

Таким образом, цитохимический анализ метафазных хромосом человека с использованием специфических антител к 5-метилцитозину позволил обнаружить новый вариант дифференциальной исчерченности, который можно рассматривать как М-сегментацию. В какой мере рисунок М-метилирования хромосом культивированных лимфоцитов характерен для клеток других тканей, зависит ли он от функциональной организации хромосом, изменяется ли он в эмбриогенезе и в процессе клеточной дифференцировки рассмотрено в следующем разделе.

10.4.2. Некоторые особенности паттерна метилирования хромосом в эмбриогенезе человека

10.4.2.1. Характеристика М-сегментации хромосом из лимфоцитов пуповинной крови у плодов 20–24 недель развития

М-рисунок хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов из пуповинной крови у 5 плодов человека 22–24 недель развития оказался идентичным таковому в лимфоцитах периферической крови доноров (рис. 10.25)*. Однако интенсивность флуоресценции многих М⁺-сегментов, за исключением хромосом 4 и 19, заметно отличалась. Отличия были статистически достоверны для 22 М-сегментов, совпадающих с R-сегментами (М⁺-R), для семи, совпадающими с T-сегментами (М⁺-T), а также для района прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9 (табл. 10.5). Интенсивность флуоресценции М⁺-R-сегментов у плодов менялась как в сторону увеличения, так и уменьшения по сравнению с таковой в аналогичных сегментах хромосом от взрослых индивидов, в то время как для М⁺-T-сегментов было характерно лишь ее уменьшение. Примечательно, что разница в интенсивности флуоресценции М-сегментов, как правило, не превышала 1 балла, что может свидетельствовать о небольших различиях статуса метилирования.

Согласно нашим наблюдениям, различия по интенсивности флуоресценции между гомологичными хромосомами из ФГА-стимулированных лимфоцитов плода и взрослых индивидуумов отмечаются в общей сложности по 30 сегментам. При этом в 13 сегментах у плода флуоресценция была интенсивнее, а в 17 — менее яркой, чем в гомологичных сегментах

* Рисунок на цв. вкл.

Таблица 10.5. Различия интенсивности флуоресценции сегментов хромосом в ФГА-стимулированных лимфоцитах взрослых индивидов и плодов человека

Хромосома	Сегмент	Характеристика сегмента	Интенсивность флуоресценции, баллы	
			Взрослые лимфоциты	Фетальные лимфоциты
1	1q42	(T)	4	3
	1q44	(R)	2	3
2	2q23	(R)	1	2
	2q31	(R)	1	2
	2q33	(R)	1	3
3	3q21	(R)	4	3
	3q25	(R)	3	2
4	–	–	–	–
5	5q13	(R)	4	3
6	6p11.2	(R)	1	3
7	7p13	(R)	2	3
	7p15	(R)	2	3
8	8q11.2	(R)	2	3
9	9q12	(C)	3	2
	9p13	(R)	2	3
10	10q24	(R)	2	3
	10q26	(T)	4	3
11	11q23	(T)	4	3
12	12p13	(R)	4	3
	12q13	(T)	4	3
13	13q22	(R)	1	3
14	14q13	(R)	2	3
	14q22	(R)	2	3
15	15q11.2	(R)	3	2
	15q13	(R)	3	2
16	16q22	(R)	3	2
17	17q21	(T)	3	2
18	18q11.2	(R)	3	2
19	–	–	–	–
20	20q11.2	(T)	4	3
21	21q11.2	(R)	3	2
22	22q11.2	(T)	4	3

хромосом из лимфоцитов взрослых. Особенно значительные различия отмечены для хромосомных сегментов 2q33, 6p11.2 и 13q22, интенсивность флуоресценции которых в фетальных лимфоцитах на 2 балла превышала таковую во взрослых лимфоцитах. Анализ генетического состава этих сегментов показывает, что в 2q33 локализованы гены CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный протеин), ICOS, AILIM (ответственные за взаимодействие Т- и В-лимфоцитов), ADAM3 (контролирующий синтез металлопротеинов), в 13q22 — семейство генов, регулирующих синтез факторов некроза тканей (TNFRCF) и эндотелиновый рецептор (EDNRB). Не исключено, что во время эмбриогенеза функция этих генов, столь важная в постнатальном развитии, может быть подавлена. Их включение (деметилирование) происходит на более поздних стадиях онтогенеза.

Таким образом, выявленные различия в характере метилирования метафазных хромосом и их гомологичных сегментов в однотипных клетках могут отражать существенные особенности функциональной активности генов, входящих в состав этих сегментов, на разных стадиях онтогенеза.

Примечательно, что уровень метилирования прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в лимфоцитах периферической и пуповинной крови также варьировал. Интенсивность флуоресценции гетерохроматина хромосом 1 и 16 в лимфоцитах плода и взрослого всегда была высокой (4 балла) и не зависела от размера блока. Для района 9q12 был характерен сигнал меньшей интенсивности, который соответствовал 3 баллам в лимфоцитах взрослых и 2 баллам в лимфоцитах плодов. Напомним, что в состав гетерохроматина хромосомы 9 преимущественно входят сателлиты III и β , более богатые CG-основаниями по сравнению с сатДНК других классов. Поэтому слабая интенсивность флуоресцентного сигнала района 9qh по сравнению с другими гетерохроматиновыми блоками, вероятно, детерминирована его гипометилированным состоянием, особенно выраженным в клетках плода.

Нет сомнения, что данные по интенсивности флуоресценции сигналов, полученные при визуальной оценке, носят ориентировочный характер. Для точной регистрации различий необходимо сравнение денситометрических профилей М-рисунок, а для понимания их причин — сведения не только о геномном составе сравниваемых сегментов, но и об экспрессионных профилях соответствующих клеток на разных стадиях онтогенеза.

10.4.2.2. Общая характеристика

М-сегментации хромосом у эмбрионов 5–8 недель развития

Пилотное исследование, проведенное нами на «прямых» препаратах из хориона и эмбриональных тканей плода у двух эмбрионов с нормальным кариотипом 5/6 недель развития, показало, что в целом число и распределение М-сегментов по хромосомам в эмбриональных клетках соответствует М-сегментации хромосом лимфоцитов (рис. 10.26 а, б)*. Однако, если в лимфоцитах гетероморфизм гомологов по интенсивности флуоресценции АТ–МеС касался только районов 1qh, 9qh, 16qh и коротких плеч хромосом групп D и G, то в клетках эмбрионов I триместра развития такие различия обнаружены для большинства хромосом набора. Аналогичное явление отмечалось нами при анализе статуса метилирования хромосом в цитотрофобласте хориона методом ник-трансляции *in situ* с преобработками ДНКазой I и рестриктазой HpaII (см. раздел 10.2.6). Сравнение локализации гомологичных сегментов, отличающихся по интенсивности флуоресценции АТ–МеС и ник-трансляционного сигнала, показало, что спектр таких сегментов зависит от метода детекции метилированных участков. Например, доказанные методом ник-трансляции с преобработкой HpaII различия по уровню метилирования локуса 15q11-q13 в эмбриональных клетках (рис. 10.17)*, оказались не выявлены иммуноцитохимическим методом (рис. 10.26, а, б)*. Дискордантность полученных результатов в значительной мере определяется разрешающей способностью методов. Считается, что иммуноцитохимический метод уступает в чувствительности методу ник-трансляции *in situ*, опосредованной рестриктазами, и мало пригоден для детекции различий в степени метилирования хромосом на уровне отдельных сегментов [610]. Между тем, тканеспецифичные различия по степени метилирования гомологов в импринтированном локусе — 11p15 подтверждаются двумя обсуждаемыми методами (рис. 10.18 и 10.26 а – в)*. Не вызывают сомнения также межклеточные различия в уровне метилирования районов прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16, наглядно продемонстрированные как при использовании метода ник-трансляции (рис. 10.19)*, так и при помощи АТ–МеС (рис. 10.26, а – в)*. Однако вывод о различном уровне метилирования R- и G-сегментов гомологичных хромо-

* Рисунок на цв. вкл.

сом в разных тканях, основанный на визуальной оценке интенсивности флуоресцентных сигналов, требует серьезных доказательств, которые могут быть получены путем кропотливого анализа особенностей М-сегментации хромосом в клетках, имеющих различное эмбриональное происхождение.

10.4.2.3. Особенности М-рисунка хромосом у эмбрионов доимплантационных стадий развития

Особый интерес представляет исследование статуса метилирования метафазных хромосом у эмбрионов человека ранних стадий развития. С этой целью нами предпринят анализ М-сегментации хромосом у дробящихся зародышей, полученных по программам экстракорпорального оплодотворения. Все эмбрионы после регистрации трех пронуклеусов были признаны непригодными для трансплантации.

Прежде всего, следует отметить нечеткость М-сегментации (рис. 10.27–10.31)^{*}, которая, по-видимому, обусловлена не столько условиями приготовления препаратов из дробящихся зародышей, сколько особенностями метилирования хромосом на этих стадиях развития. В целом, типичными для хромосом 2–8-клеточных эмбрионов оказались невысокая интенсивность флуоресценции и наличие гемиметилирования (метилирование только одной хроматиды). При этом большинство хромосом в blastomeres имели точечные сигналы AT–MeC, и лишь некоторые — ярко выраженные М-сегменты. Вероятно, наблюдаемая картина отражает активно происходящие процессы деметилирования на этих стадиях развития.

Первые М-сегменты появляются на отдельных хромосомах, начиная со стадии 8 blastomeres (рис. 10.31)^{*} и становятся характерными для большинства хромосом на стадии blastocyst. М-рисунок хромосом на стадии blastocyst тождественен или приближается к таковому в лимфоцитах пуповинной крови. Однако данный вывод требует более строгих экспериментальных подтверждений.

Гемиметилирование четко определяется в отдельных хромосомах, начиная со стадии двух blastomeres и, вероятно, обусловлено пассивным деметилированием, т. е. отсутствием метилирования в дочерней хроматиде. Наличие гемиметилированных хромосом на ранних стадиях дробления ранее было описано у зародышей мышей [307] и круп-

^{*} Рисунок на цв. вкл.

ного рогатого скота [325]. В то же время у зародышей кроликов и овец процессы деметилирования генома происходят с задержкой на 2–3 деления дробления [671, 902].

У эмбрионов на стадии морулы, когда активизируется процесс метилирования *de novo*, выявлены хромосомы, в которых одна хроматида была полностью, а другая лишь частично метилирована (рис. 10.29)*.

Характерными для отдельных гемиметилированных хромосом были и сестринские хроматидные обмены, то есть обмены метилированными и неметилированными сегментами сестринских хроматид (рис. 10.27)*. Ранее сестринские хроматидные обмены были зарегистрированы при культивировании дробящихся зародышей мышей в среде с добавлением бромдезоксипуридина [143], а сравнительно недавно были обнаружены и у других млекопитающих при использовании АТ–MeC [307].

Особый интерес представляло сравнение паттернов метилирования гомологичных хромосом у эмбрионов на доимплантационных стадиях развития. При полной идентичности QFH-рисунка всех гомологичных хромосом в различных клетках некоторые хромосомы в бластомерах резко отличались по интенсивности флуоресценции АТ–MeC. Например, два гомолога из триады хромосом 17 оказались гипометилированными, тогда как в одном гомологе М-сегментация выявлялась уже на стадии 8 бластомеров (рис. 10.29)*. Учитывая, что у триплоидных зародышей человека, возникающих в условиях *in vitro* преимущественно вследствие диспермного оплодотворения, удвоены хромосомы отцовского происхождения, именно они, скорее всего, и оставались гипометилированными по сравнению с хромосомой материнского происхождения. Заметные отличия статуса метилирования определяются и для гомологов других хромосом в метафазных пластинках триплоидных 8-бластомерных зародышей (рис. 10.30)*. Асинхронность метилирования гомологов, по-видимому, отражает исходные различия в состоянии метилирования хромосом мужского и женского пронуклеусов [902]. Деметилирование отцовского генома у мышей, свиней, а по некоторым данным, и у человека происходит уже на стадии пронуклеусов, тогда как хромосом ооцита — только во время делений дробления [671]. По-видимому, именно отцовские хромосомы остаются гипометилированными и во время первых делений дробления у триплоидных зародышей андрогенетического происхождения. Учитывая большое

* Рисунки на цв. вкл.

значение процессов метилирования для функциональной активности генов, этот феномен требует более строгих экспериментальных доказательств. В частности, особенно важным представляется сравнение статуса метилирования гомологов разного родительского происхождения и его сопоставление с данными о функциональной активности генов, локализованных в этих хромосомах. Известно, что у доимплантационных зародышей мышей экспрессируется около 10 000 генов, многие из которых (примерно 4 %) активны только на этих ранних стадиях развития [564]. В каких хромосомах человека локализованы «ранние» гены, как их активность коррелирует с состоянием метилирования, зависит ли она от родительского происхождения остается неизвестным и заслуживает серьезных дополнительных исследований.

Не менее интересным, а в функциональном значении и более загадочным, является гипометилированное состояние прицентромерных гетерохроматиновых блоков хромосом 1, 9 и 16, которое сохранялось вплоть до стадии бластоцисты. Как уже упоминалось выше, гипометилированные блоки конститутивного гетерохроматина являются характерной особенностью хромосом цитотрофобласта хориона. Вместе с тем, в клетках других тканей у эмбрионов в 5–12 недель развития, а также в цитотрофобласте плаценты и лимфоцитах пуповинной крови (второй триместр беременности) районы 1qh, 9qh и 16qh обнаруживали интенсивную флуоресценцию AT-5MeC, что свидетельствовало об их гиперметилированном состоянии (рис. 10.32)*. Следовательно, паттерн метилирования гетерохроматина варьирует в зависимости от стадии развития.

Если гипометилированное состояние является характерным свойством гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 и Y мужского пронуклеуса [493], то имеет ли функциональное значение гипометилирование конститутивного гетерохроматина в женском пронуклеусе, или оно является простым следствием глобального деметилирования генома на этой стадии развития? Почему деметилированное состояние гетерохроматина обоих гомологов характерно для хромосом цитотрофобласта на протяжении I триместра и меняется на метилированное в плодный период? На какой стадии начинается метилирование этих блоков в плаценте? Почему те же гетерохроматиновые блоки на обоих гомологах оказываются метилированными у эмбрионов в период ак-

* Рисунок на цв. вкл.

тивного органогенеза? Что реально стоит за этим феноменом? Эти и другие вопросы остаются пока без ответа и заслуживают дальнейшего изучения.

Считается, что районы прицентромерного гетерохроматина не содержат структурных генов и не участвуют в процессах транскрипции. Вместе с тем, предположения об участии этих районов в регуляции работы ближайших к ним генов, контролирующих ранние стадии развития у человека [134, 637, 878] получают многочисленные подтверждения. Не исключено, что именно в них находятся блоки транспозонов, а также повторяющихся последовательностей, продукты которых, как было недавно установлено, играют важную роль в обеспечении функциональной активности генов на начальных стадиях эмбриогенеза млекопитающих [760].

Следует обратить внимание на то, что наши исследования были проведены на триплоидных эмбрионах доимплантационных стадий развития. Отражают ли данные, полученные на триплоидных зародышах, реальную динамику процессов метилирования/деметилирования хромосом у нормальных диплоидных зародышей человека остается неизвестным. Существенно подчеркнуть, что развитие триплоидных зародышей человека происходит медленнее, чем зародышей с нормальным кариотипом; они имеют пониженную жизнеспособность и для них характерны множественные врожденные пороки. Однако некоторые триплоидные эмбрионы сохраняют способность не только к имплантации и внутриутробному развитию, но и к живорождению. Возможно, что метилирование как один из механизмов регуляции раннего развития человека, способно компенсировать хромосомный дисбаланс путем инактивации дополнительного хромосомного материала, по крайней мере, в отдельных районах хромосом, возможно, наиболее значимых для определенного этапа эмбрионального развития, как это было показано нами на примере трисомии 13 и 16 [145].

Гипометилирование генома бластомеров дробящихся зародышей, асимметричность рисунка метилирования (гемиметилирование) хромосом при первых делениях дробления, сменяющаяся типичной картиной М-сегментации хромосом на стадии морулы — бластоцисты, сестринские обмены, регистрируемые на гемиметилированных хромосомах — все эти особенности метилирования у доимплантационных зародышей человека описаны нами впервые [125]. Ранее эти особен-

ности паттерна метилирования были отмечены у зародышей ранних стадий развития других млекопитающих [260, 307, 516, 902]. В наших исследованиях обнаружены, по крайней мере, две особенности метилирования хромосом человека, ранее не отмеченные у других млекопитающих: существенные различия в метилировании гомологичных хромосом и отсутствие метилирования блоков гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 независимо от их родительского происхождения.

Таким образом, паттерн метилирования метафазных хромосом зародышей человека доимплантационных стадий развития имеет ряд важных особенностей, отличающих его от такового у эмбрионов и плодов человека более поздних стадий развития. В этой связи особый интерес приобретают исследования особенностей метилирования метафазных хромосом эмбриональных стволовых клеток человека, получаемых при культивировании бластоцисты [149]. В какой мере хромосомы эмбриональных стволовых клеток сохраняют статус метилирования, свойственный доимплантационным зародышам является предметом наших дальнейших исследований.

В заключение уместно напомнить, что иммуноцитохимический метод с использованием специфических антител не позволяет судить о метилировании, то есть о функциональном состоянии единичных генов и позволяет выявлять только сравнительно крупные фрагменты хромосом с высокой концентрацией метилированных CpG-динуклеотидов. Более четкая информация о паттерне функциональной активности хромосом в эмбриогенезе человека, в том числе при клеточной и тканевой дифференцировке может быть получена только в условиях комплексных цитогенетических, молекулярных и биохимических исследований зародышей ранних стадий развития.

10.5. Морфометрические характеристики гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16

Как уже отмечалось, доступность районов конститутивного гетерохроматина в клетках цитотрофобласта для рестрикции эндонуклеазами в значительной степени определяется их деконденсированным состоянием. Учитывая наличие корреляции между конденсацией и метилированием [899], есть основания предполагать, что гипометилированное состояние хромосом должно сопровождаться их деконденсацией. В таком случае, морфометрические характеристики отдельных

сегментов хромосом могут быть использованы в качестве критерия для оценки состояния при различных условиях. В этой связи представлялось целесообразным охарактеризовать морфометрические особенности гетерохроматиновых районов хромосом у эмбрионов и плодов человека разных сроков развития.

Единичные работы, выполненные на культурах фибробластов и лимфоцитов человека, показали наличие определенной динамики линейных размеров и селективную нейтральность гетерохроматиновых районов в эмбриогенезе человека [2, 117]. Между тем, условия клеточных культур вряд ли адекватны для суждения о нативном состоянии гетерохроматина в эмбриональных клетках. Такая информация может быть получена только при изучении гетерохроматина *in situ* или на прямых хромосомных препаратах.

Нами проведено морфометрическое исследование гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16 в спонтанно делящихся клетках цитотрофобласта хориона у эмбрионов и плодов человека 6–20 недель развития. Значительная вариабельность размеров блоков гетерохроматина на «прямых» препаратах не вызывает сомнения. Эти различия особенно резко выражены при сравнении гетерохроматиновых блоков хромосом из хориона с вариантами qh^+ в культурах лимфоцитов пуповинной крови плода (табл. 10.6). Обращает на себя внимание факт высокой частоты варианта $9qh^+$ в клетках цитотрофобласта по сравнению с лимфоцитами, а также тенденция к снижению частоты вариантов qh^+ для каждой хромосомы по мере развития плода.

Таблица 10.6. Частоты увеличенных гетерохроматиновых блоков* (qh^+) хромосом 1, 9, 16 у эмбрионов и плодов человека на разных сроках эмбрионального развития

Срок развития, нед.	Всего клеток	Хромосома 1		Хромосома 9		Хромосома 16	
		Число qh^+	%	Число qh^+	%	Число qh^+	%
Клетки цитотрофобласта (прямые препараты)							
12	111	18	16,2 %	57	51,5 %	16	15,3 %
14–15	82	21	25,6 %	41	50 %	13	15,9 %
18–20	199	29	14,6 %	89	44,7 %	27	14,6 %
ФГА-стимулированные лимфоциты пуповинной крови							
20–29	80	10	12,5 %	14	17,5 %	8	10 %

* Размеры блоков оценивались визуально на препаратах метафазных хромосом, окрашенных флуорохромом Hoechst 33258 с контрастированием актиномицином D. Препараты приготовлены стандартными методами из материала, полученного с целью пренатальной диагностики хромосомных болезней

Морфометрические исследования гетерохроматиновых районов проведены на препаратах хориона плодов 6–20 недель развития. Абсолютные и относительные размеры С-блоков хромосом 1, 9 и 16 измеряли на проекции с изображений метафазных пластинок, окрашенных С-методом [148]. От каждого эмбриона анализировали по 10–20 метафазных пластинок в интервале спирализации хромосомы 2 от 6,4 до 11 мкм (в этом интервале, согласно коэффициентам линейной регрессии, не было выявлено отклонений от линейной зависимости).

Характер распределения абсолютных и относительных размеров С-блоков для всех хромосом соответствовал нормальному. Средние значения размеров С-блоков варьировали для каждой хромосомы и не зависели от стадии развития (табл.10.7).

При сравнении полигонов частот абсолютных размеров С-блоков хромосомы 1 обнаружено смещение распределения в сторону больших значений для эмбрионов раннего (6–8 недель) по отношению к поздним (18–20 недель) срокам развития (рис. 10.33, а) Для гетерохроматиновых районов хромосом 9 и 16 такая зависимость не прослеживается (табл.10.6).

Морфометрический анализ этих же сегментов хромосом 1, 9 и 16 в клетках цитотрофобласта был продолжен на препаратах, окрашенных Н33258/АсD. Выявляемые при таком способе окраски гетерохроматиновые Q-сегменты исследовали при помощи полуавтомати-

Таблица 10.7. Абсолютные размеры С-сегментов хромосом 1, 9 и 16 в клетках цитотрофобласта на разных стадиях эмбрионального развития

Хромосома	Срок развития, нед.	Число эмбрионов	Число хромосом	Размер С-сегментов $\bar{X} \pm S_x$, мкм
1	6–8	9	18	1,61 ± 0,07
1	12	4	8	1,48 ± 0,08
1	14–15	5	10	1,64 ± 0,14
1	18–20	7	14	1,39 ± 0,06
9	6–8	4	8	1,24 ± 0,04
9	12	4	8	1,29 ± 0,13
9	14–15	4	8	1,24 ± 0,10
9	18–20	5	10	1,31 ± 0,09
16	6–8	4	8	1,09 ± 0,03
16	12	4	8	1,03 ± 0,05
16	14–15	4	8	1,16 ± 0,07
16	18–20	5	10	1,08 ± 0,03

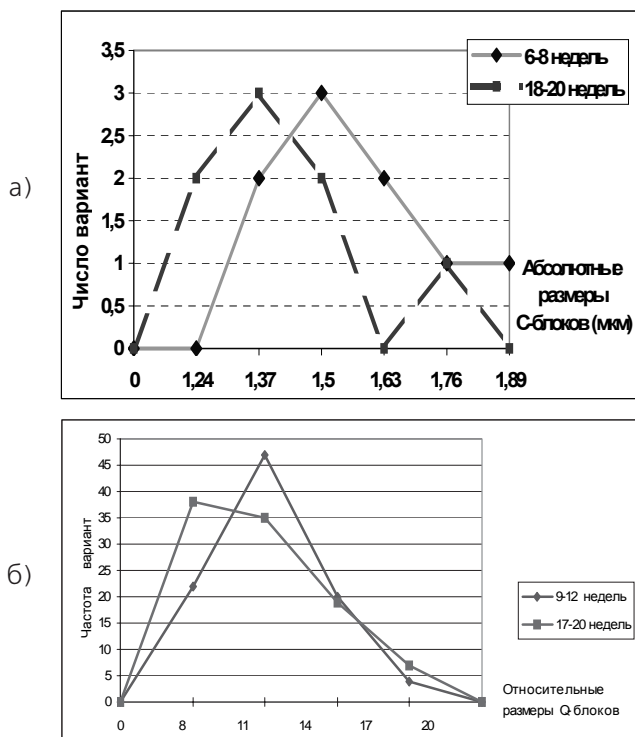


Рис. 10.33. Распределение абсолютных (а) и относительных (б) размеров района 1qh метафазных хромосом в клетках цитотрофобласта хориона и плаценте

ческой системы анализа изображений с программным обеспечением, позволяющим точно измерять линейные размеры сегментов хромосом (Видео-Тест, Карио 1.5). Для исключения межклеточного полиморфизма от каждого из 129 эмбрионов исследовали по 1 метафазной пластинке, на которых измеряли длину хромосом и соответствующих Q-блоков. Уточнение границ блоков проводили по экстремумам производной кривой яркости. Длину гетерохроматинового сегмента определяли в процентах от длины хромосомы.

Установлено, что характер распределения размеров Q-сегментов гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 достоверно отличается от нормального (Гауссового) распределения ($tAs > 3$) и аналогичен полученному на первом этапе исследований С-сегментов (рис. 10.33, б). Вместе с тем,

интересно отметить, что при статистической обработке с использованием дисперсионного анализа двухфакторных неравномерных комплексов зависимость размеров гетерохроматиновых районов от стадии развития оказалась значимой только для блоков 9qh и 16qh ($F = 1,00$, $P > 0,05$; $F = 10,82$, $P < 0,05$; $F = 3,10$, $P < 0,01$ соответственно). Размеры этих же блоков достоверно отличались в цитотрофобласте и тканях зародышевого происхождения у эмбрионов 6–10 недель развития (табл. 10.8). Полученные нами результаты подтверждают полученные ранее данные об увеличении размеров С-блоков хромосом 1, 9 и 16 в экстраэмбриональных тканях по сравнению с эмбриональными [119].

Учитывая очевидные недостатки морфометрического подхода, обусловленные выраженными межиндивидуальными различиями размеров гетерохроматиновых блоков, зависимости их размеров от степени спирализации хромосом и способов их окраски, а также от субъективных факторов (способы измерений, пределы допускаемых погрешностей и т. д.), данный подход едва ли может рассматриваться как перспектив-

Таблица 10.8. Сравнение относительных размеров Q-гетерохроматиновых блоков в различных тканях плода (Т-критерий Уайта)

Хромосома	№ эмбриона	Число проанализированных хромосом		T ₃
		Эмбриональные клетки	Клетки цитотрофобласта	
1	1	24	5	23,5*
1	2	30	2	23,5**
1	3	16	7	119,5 **
1	4	11	2	15,5 ***
1	5	1	4	2 ***
1	6	10	4	23,5 **
9	1	17	3	37 **
9	2	6	6	37 **
9	3	7	4	20,5 **
16	4	24	4	59,5 **
16	2	28	2	47,5 **
16	3	18	9	98 **
16	4	11	4	25,5 **
16	5	12	3	21 **

* $p > 0,05$.

** $p < 0,01$.

*** Нет критического значения.

ный в цитогенетике развития человека. Тем не менее, он позволил установить различия в размерах гетерохроматиновых блоков хромосом 1, 9 и 16 в клетках хориона по сравнению с клетками собственно эмбриональных тканей и тенденцию к уменьшению линейных размеров этих блоков с 6-й по 20-ю неделю внутриутробного развития.

Результаты морфометрического анализа в целом хорошо согласуются с данными по структурно-функциональной организации хромосом, полученными с помощью других, более чувствительных и более специфичных методов (см. раздел 10.3, 10.4). Наличие крупных и, соответственно, менее спирализованных блоков гетерохроматина в цитотрофобласте хориона ранних зародышей человека хорошо согласуется с их гипометилированным состоянием в клетках цитотрофобласта и может свидетельствовать в пользу наличия функционально активных «ранних» генов в гетерохроматиновых районах этих хромосом. Выявленная в ходе эмбрионального развития тенденция к уменьшению размеров гетерохроматиновых блоков, которое сопровождается их конденсацией и метилированием, подтверждается молекулярными и иммуноцитохимическими методами. Эти данные служат косвенным доказательством роли конститутивного гетерохроматина в инактивации «ранних» генов.

10.6. Особенности репликации хромосом в эмбриогенезе человека

Репликация (репродукция) хромосом, состоящая в воспроизведении клеткой в каждом цикле деления полного набора хромосом, происходит на молекулярном уровне и касается двух основных компонентов хромосомы — ДНК и гистонов.

Подходы к анализу репликации ДНК хромосом на цитологическом уровне, разработанные в 1970–1980-е годы, основаны на введении в пролиферирующие клетки предшественников ДНК в период синтеза (S-фазы) и изучении особенностей их включения в отдельные сегменты хромосом на стадии метафазы после завершения репродукции. Обычно в качестве модифицированного основания ДНК используют аналог тимидина — 5-бромдезоксимуридин (БДУ). Репликационный метод сегментации хромосом позволяет изучать синхронность репликации сегментов хромосом, обусловленную особенностями работы репликационного комплекса, как внутри одного клеточного цикла, так

в нескольких делениях клетки. Так, долговременная инкубация клеток с БДУ (в течение одного и более клеточных делений) используется для регистрации сестринских хроматидных обменов [64] и оценки продолжительности клеточного цикла [849]. Введение БДУ в S-периоде и регистрация результатов на стадии метафазы того же клеточного цикла позволяет изучать порядок репликации отдельных хромосом и их сегментов (получение R-, G- или C-репликационной исчерченности) [221, 320, 495]. Наиболее детальная характеристика паттерна репликации может быть получена при кратковременном (импульсном) введении БДУ в разные отрезки времени на протяжении S-периода. Регистрация участков хромосом, включивших БДУ, основана на изменениях структуры хроматина и способности к окрашиванию некоторыми флуорохромами (например, акридиновым оранжевым) или красителем Гимза после УФ-облучения. Наибольшей чувствительностью обладает иммуноцитохимический метод детекции БДУ с помощью специфических антител, которые связываются с доступными эпитопами на однонитевой ДНК независимо от структуры хроматина [320].

Эти цитологические подходы позволили установить основные закономерности репликации сегментов хромосом и выявить взаимосвязь процесса репликации с другими матричными процессами в хромосомах эмбрионов человека.

Хорошо известно, что R-сегменты реплицируются в ранней S-фазе, в то время как G- и C-сегменты — в поздней [474]. Показано также, что в период R/G-перехода, когда прекращается репликация R-сегментов и инициируется репликация G-сегментов, некоторые R- и G-сегменты реплицируются одновременно [276]. Этот период (средняя S-фаза) характеризуется снижением или прекращением синтеза ДНК, возможно, является контрольной точкой клеточного цикла [320]. Разделение S-фазы достаточно условно, т. к. многочисленные периоды замедления или остановки репликации ДНК указывают на существование множества перекрывающихся субфаз синтеза ДНК [196].

Тем не менее, репликация каждого сегмента в S-фазе строго упорядочена [757, 758], а последовательность репликации участков хромосом определяется их транскрипционной активностью [831]. Так, при репликации генов до R/G-перехода наблюдается их экспрессия в клетке, в то время как репликация данных локусов после R/G-перехода сопровождается отсутствием транскрипционной активности [351,

405, 757, 759]. При этом изменение транскрипционного статуса влияет на репликационный статус хромосомного сегмента. Время репликации сегмента может изменяться в зависимости от типа ткани, что, по-видимому, связано с транскрипционной активностью тканеспецифичных генов. Например, в лимфоцитах хромосомы 4, 5, 8 и 13 заканчивают репликацию позже, чем в фибробластах почки, в то время как хромосомы 15, 19, 20 и 22 реплицируются в лимфоцитах раньше, чем в фибробластах [419].

Несмотря на то, что инициация времени репликации в индивидуальных сегментах хромосом находится под жестким генетическим контролем, гомологичные сегменты могут реплицироваться асинхронно, т. е. с некоторым интервалом во времени [371]. Следовательно, контроль над репликацией сегмента в каждой отдельной хромосоме осуществляется более строго по сравнению с регуляцией репликации гомологичных сегментов [777]. Асинхронная репликация наиболее выражена для импринтированных локусов, которые характеризуются различным функциональным статусом хроматина в гомологичных хромосомах [575]. Так, если асинхронная репликация сегментов, содержащих импринтированные локусы, наблюдается в 40–90% клеток в разных тканях, то для остальных сегментов этот показатель не превышает 10% [371]. Возможно, что механизмы асинхронной репликации сегментов, содержащих импринтированные и неимпринтированные локусы, могут быть различны [721].

Таким образом, время репликации, жестко взаимосвязанное с транскрипционной активностью хроматина, можно рассматривать как маркер функционального статуса сегмента хромосомы. Поэтому, изучая особенности репликации отдельных хромосомных сегментов в клетках эмбриональных и экстраэмбриональных тканей на разных сроках развития, можно косвенно оценить их роль в процессе дифференцировки клеток эмбриона и хорион-аллантаоидной плаценты.

Следует отметить, что при изучении порядка репликации хромосомных сегментов хромосом необходимо иметь представление о продолжительности клеточного цикла в целом и S-фазы в частности. Известно, что длительность стадий клеточного деления варьирует в разных тканях и на разных этапах онтогенеза. Например, для ранних этапов эмбриогенеза отмечена укороченная S-фаза с интенсивной репликацией ДНК, которая обеспечивается увеличенным числом сайтов ини-

циации репликации [653]. Однако сведения о временных параметрах клеточного цикла в цитотрофобласте хориона и плаценты противоречивы. Так, при длительности М-фазы не более 1 часа общая продолжительность клеточного цикла оценивается в 15 или 36 часов, а длительность S-фазы — от 5,5 до 10–16 часов, фазы G2 — 2–4 часа [33, 903]. Кроме того, при изучении клеточного цикла в условиях *in vitro* следует учитывать особенности используемых методов. В частности, БДУ в высоких концентрациях способен приводить к замедлению процесса репликации вплоть до полного ее блокирования, что сопровождается изменением длительности S-фазы [64, 320, 903]. Таким образом, изучение параметров клеточного цикла представляет самостоятельный научный интерес и требует использования специальных методов.

Стратегия нашего исследования заключалась в анализе метафазных пластинок из спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта и эмбриональных тканей, которые находились на разных стадиях клеточного цикла после 24-часовой инкубации в питательной среде, лишенной синхронизирующих агентов. При инкубировании фрагментов тканей в каждый культуральный флакон с определенной периодичностью импульсно добавляли БДУ. Схема проведения экспериментов представлена на рисунке 10.34*. После фиксации материала и приготовления препаратов «прямым» методом проводили регистрацию включения БДУ в сегменты хромосом, используя моноклональные антитела к БДУ (АТ-БДУ). Поэтому наше исследование последовательности репликации, по существу, сводилось к регистрации сегментов, реплицирующихся одновременно в разные периоды времени на протяжении всего периода инкубации. Избранный нами подход не требует четкого знания о временных параметрах клеточного цикла, тем более что сведения о продолжительности отдельных его стадий в клетках цитотрофобласта, включая длительность S-фазы, согласно данным литературы значительно варьируют. Однако, используя в качестве маркера прохождения клетками одного клеточного цикла наличие в одной из сестринских хроматид БДУ [64], мы попытались уточнить продолжительность S-фазы клеточного цикла в клетках цитотрофобласта хориона.

В клетках цитотрофобласта метафазные пластинки с флуоресцентным сигналом АТ-БДУ только в одной из сестринских хроматид были получены после инкубации в течение 23 часов с добавлением БДУ на первые

* Рисунок на цв. вкл.

два часа (рис. 10.35)*. Следовательно, в течение 24 часов клетки прошли фазы G₂, M, G₁, S, G₂ и снова вошли в митоз. Таким образом, с учетом литературных данных о временных параметрах фаз M и G₂ можно предположить, что суммарная продолжительность фаз G₁ и S в митотическом цикле клеток цитотрофобласта составляет 15–17 часов [137].

При анализе характера репликационной структуры хромосом 500 метафазных пластинок из клеток эмбриональных тканей и цитотрофобласта хориона от 5–12-недельных эмбрионов, оказалось, что они могут быть подразделены на несколько типов. После первых 6 часов инкубации в большинстве метафазных пластинок включение БДУ наблюдалось преимущественно в R-сегменты. Однако в отдельных случаях сигнал АТ-БДУ был зарегистрирован также и в единичных G- и C-сегментах. В следующие 8 часов инкубации характер репликационной исчерченности можно условно подразделить на пять типов: R-, R+G-, G-, G+C- и C-сегментация. В последние 6 часов инкубации тип сегментации соответствовал R+G-, G-, G+C- или C-рисункам [137].

Следует отметить, что при преимущественном включении БДУ в R-сегменты флуоресцентные сигналы были представлены множеством точек (рис. 10.36, а)*. Возможно, этот феномен, характерный для ранней S-фазы, соответствует сотням репликационных вилок, равномерно распределенным внутри нуклеоплазмы интерфазного ядра [381] (рис. 10.36, б)*. При включении БДУ в поздней S-фазе репликационный рисунок был представлен интенсивно флуоресцирующими четкими полосами, соответствующими G- и C-сегментам хромосом (рис. 10.37, а)*, что, возможно, отражает уменьшение числа вилок репликации при увеличении их размера [381] (рис. 10.37, б)*. Таким образом, характер репликационного рисунка, полученного в результате включения аналога тимидина в начале или конце S-фазы, может служить косвенным маркером времени репликации того или иного сегмента.

В подавляющем большинстве метафазных пластинок в цитотрофобласте и реже — в клетках эмбриональных тканей наличие сигнала АТ-БДУ было зарегистрировано в гетерохроматиновых районах хромосом 1, 9, 16, 15 и 22 и в некоторых G-сегментах (14–150 на метафазную пластинку), что свидетельствовало об одновременности их репликации (рис. 10.38)*. Интересно, что число и локализация

* Рисунок на цв. вкл.

G-сегментов, реплицирующихся синхронно с гетерохроматином хромосом 1, 9, 16, существенно варьировали в зависимости от происхождения клетки и от срока развития эмбриона. Так, если в цитотрофобласте у эмбрионов 5–7 недель развития общее число G-сегментов, реплицировавшихся одновременно с гетерохроматином достигало 150, а доля таких метафаз — 90%, то в срок 12–13 недель эти показатели снизились более чем в два раза. В эмбриональных клетках в отличие от цитотрофобласта гетерохроматиновые районы, как правило, реплицировались изолированно, и только в 30% эмбриональных клеток была зарегистрирована одновременная репликация гетерохроматина и G-сегментов. Сравнение репликационной структуры хромосом 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 21 и 22 показало, что различия во времени репликации G-сегментов более выражены между цитотрофобластом и эмбриональными клетками у эмбрионов 5–7 недель, чем 12–13 недель развития (52 и 16 сегментов соответственно, $P < 0,05$) [701].

Феномен тканеспецифичных и стадиоспецифичных различий во времени репликации сегментов может быть обусловлен несколькими причинами. Наиболее вероятно, что одной из них являются различия в параметрах клеточного цикла, другой — изменение транскрипционной активности генов, локализованных в изучаемых сегментах. Если исходить из постулата, что цитологической характеристикой конститутивного гетерохроматина является репликация в конце S-фазы, то есть позже по сравнению с другими сегментами хромосом [158, 610], то уменьшение реплицирующихся синхронно с гетерохроматином G-сегментов можно объяснить их более ранней репликацией. Принимая во внимание, что в G-сегментах преимущественно локализованы тканеспецифичные гены [568], нельзя исключить, что их транскрипционная активность необходима для конечных этапов формирования хорион-аллантаоидной плаценты, завершающегося к 13 неделям развития [49]. Незначительное число таких «рано реплицирующихся» G-сегментов в эмбриональных клетках в срок 5–12 недель, возможно, связано с необходимостью функционирования многих генов в этот период активного органогенеза. С другой стороны, возможно, что репликация гетерохроматина в цитотрофобласте хориона начинается раньше, чем в эмбриональных клетках. Если последнее предположение справедливо, то следует признать, что в гетерохроматиновых районах, по крайней мере, некоторых хромосом локализованы гены, функцио-

нально активные только в эмбриональный период развития и именно в цитотрофобласте хориона.

Особое внимание обращали на себя различия между гомологичными хромосомами по интенсивности сигнала АТ-БДУ, вплоть до его полного отсутствия, в районах 1q12, 1p31, 1q31, 9q12, 9p21, 16q11.2, 16p12, 16q21. Вероятно, отсутствие сигнала или его слабая интенсивность, отражают различия во времени и в активности процессов репликации гомологичных районов. Эта асинхронность не зависела от тканевого происхождения клеток и наблюдалась у разных эмбрионов в 20–50 % метафазных пластинок. Таким образом, по уровню асинхронности репликации гетерохроматиновые районы и некоторые G-сегменты хромосом 1, 9 и 16 соответствовали импринтированным локусам. Наряду с гетерологичностью метилирования гомологичных хромосом, асинхронность их репликации, возможно, свидетельствует о различной функциональной значимости хромосом отцовского и материнского происхождения в эмбриогенезе человека. Однако это предположение нуждается в дополнительных специальных исследованиях.

Еще один интересный факт касается наличия клеток с разновременной репликацией гетерохроматиновых районов разных хромосом. Так, например, в цитотрофобласте на некоторых метафазных пластинках включения БДУ были зарегистрированы только в районе 16qh, в то время как в гетерохроматине хромосом 1 и 9 флуоресцентных сигналов обнаружено не было. На других метафазных пластинках БДУ содержали районы 9q12 и 16q11.2 при отсутствии сигнала в районе 1q12. При этом одновременно с гетерохроматином реплицировались некоторые G-сегменты, что характерно для начала поздней S-фазы. На некоторых метафазных пластинках одновременно с G-сегментами реплицировался только прицентромерный гетерохроматин хромосомы 1, на других — районы 1q12 и 16q11.2, в то время как в районе 9q12 включение БДУ не обнаружено. По сочетанию включения БДУ в гетерохроматиновые районы хромосом эмбриональных клеток также можно выделить несколько вариантов.

Причина этих хромосом-специфичных моделей репликации некоторых G-сегментов и гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16 остается неясной. Скорее всего, они обусловлены различиями во времени начала и окончания репликации. Поскольку варианты сочетания одновременной репликации разных сегментов хромосом в эмбриональ-

ных клетках и цитотрофобласте различны, нельзя исключить, что они маркируют клетки разной степени дифференцировки. К сожалению, на хромосомных препаратах определить принадлежность метафазной пластинки к какому-либо типу ткани не представляется возможным. Тем не менее, на «прямых» препаратах из хориона, где нами установлено две репликационные модели, метафазные пластинки представлены только клетками Лангханса, активная пролиферация которых в I триместре необходима для образования и поддержания собственно цитотрофобласта и для дифференцировки синцитиотрофобласта, покрывающего ворсины хориона. В то же время наличие большего числа моделей репликации в клетках эмбриональных тканей вполне согласуется с активной пролиферацией и дифференцировкой клеток всех типов тканей в период органогенеза. Полученные результаты подтверждают данные о тканеспецифичности порядка репликации отдельных сегментов хромосом в разных тканях, которая была обнаружена для лимфоцитов и фибробластов человека в постнатальном периоде онтогенеза человека [158, 419].

Таким образом, различия в характере репликации районов гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16 являются ткане- и стадиоспецифичными и подтверждают различный функциональный статус этих районов в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях на разных стадиях эмбриогенеза человека.

Заключение

В главе суммированы данные о морфофункциональных особенностях хромосом человека на разных, преимущественно ранних постимплантационных стадиях развития. Основная часть приведенных результатов вполне оригинальна, так как получена на прямых хромосомных препаратах из ворсин хориона (цитотрофобласт) или различных тканей собственно эмбриона человека. Данный метод делает реальным анализ метафазных хромосом уже через несколько часов после получения материала и позволяет избежать влияния культивирования на структурно-функциональные характеристики хромосом.

Основное внимание обращено на изучение районов ядрышковых организаторов (ЯОР) и конститутивного гетерохроматина, паттерн метилирования метафазных хромосом, особенности их морфологии и репликации на разных стадиях эмбриогенеза.

Установлено, что среднее число Ag+ЯОР на метафазную пластинку и их общая активность в эмбриональных и экстраэмбриональных (хорион) тканях не зависят от стадии эмбриогенеза. Основной причиной полиморфизма ЯОР хромосом у эмбрионов человека является комбинация родительских ЯО-хромосом, функциональный статус которых наследуется как стабильный признак большинством (76%) хромосом. Вместе с тем, в период с 8 до 14 недель развития отмечается возрастание суммарной транскрипционной активности кластеров рибосомных генов, которое обусловлено большей функциональной активностью *p*-генов хромосом группы G (21 и 22) по сравнению с хромосомами группы D (13, 14 и 15). Нельзя поэтому исключить реальное существование молекулярных механизмов репрессии — дерепрессии *p*-генов, регулирующих их активность во время нейруляции, активного органогенеза и плацентации. Увеличение активности экспрессии *p*-генов отмечается на более поздних стадиях эмбриогенеза и у плодов с тяжелыми пороками развития. При нормальном кариотипе у плода изменчивость характера Ag-окраски ЯОР более свойственна хромосомам группы G. Наличие дополнительной ЯО-хромосомы в кариотипе плода сопровождается увеличением числа хромосом группы D с переменными ЯОР и приводит к возрастанию общей транскрипционной активности *p*-генов. При трисомиях 21 и 13 изменчивость функционального статуса ЯОР не связана с происхождением ЯО-хромосом, тогда как при нормальном кариотипе у плода характер Ag-окраски сохраняется неизменным на хромосоме 15, унаследованной от матери.

Исследования с помощью двух вариантов метода ник-трансляции (предобработка ДНКазой I детектирует конформационные особенности ДНК, а предобработка хромосом рестриктазами MspI и HpaII выявляет гипометилированные участки ДНК) дали сходные результаты и позволили получить принципиально новые данные относительно расположения на метафазных хромосомах функционально активных районов в зависимости от типа ткани и стадии развития. Эти наблюдения были дополнены морфометрическим анализом размеров соответствующих гетерохроматиновых районов в клетках цитотрофобласта хориона и эмбриональных тканей.

Наиболее значимые результаты включают: различия в уровне метилирования некоторых гомологичных сегментов хромосом из клеток цитотрофобласта и из клеток эмбриональных тканей, различия в ме-

тировании гомологичных сегментов хромосом из клеток хориона в сравнении с аналогичными сегментами хромосом из лимфоцитов взрослых, гипометилированность районов прицентромерного хроматина в клетках цитотрофобласта.

1. Гетерологичность метилирования выражена наиболее четко для сегментов 2q11–13, 11p15 и Xq24–27 в клетках цитотрофобласта и для сегментов 15q11–13 в эмбриональных клетках. Есть основания предполагать, что именно в этих районах функционально активны гены только одного гипометилированного гомолога, контролирующего развитие хориона и плаценты (2q11–13, 11p15, Xq24–27) и дифференцировку собственно эмбриональных тканей (15q11–13). Идентичные гены тех же сегментов другого гомолога, по всей вероятности, остаются импринтированными и функционально неактивными. Уместно отметить, что именно в сегментах хромосом 11 и 15, отличающихся степенью метилирования, локализованы крупные кластеры импринтированных генов.

2. Различия в интенсивности флуоресценции антител к 5-метилцитозину на хромосомах лимфоцитов взрослого и плода особенно характерны для сегментов 2q33, 6p11.2, 13q22. Гиперметилированность этих сегментов в лимфоцитах пуповинной крови позволяет предполагать, что гены соответствующих сегментов, скорее всего, функционально неактивны в период внутриутробного развития.

3. Установлены существенные отличия в состоянии блоков прицентромерного гетерохроматина в хорионе и эмбриональных тканях — гипометилированность и слабая степень спирализации гетерохроматина в цитотрофобласте, гиперметилированность и высокая степень спирализации в эмбриональных клетках. На основании этих результатов сформулирована гипотеза о наличии в околоцентромерном хроматине хромосом 9 и 16 «ранних» генов, продукты которых необходимы для обеспечения роста хориона, формирования плаценты и их нормального функционирования. Не исключено, что в гетерохроматине локализованы гены пролиферации и клеточного роста, а также факторы их регуляции, активация и инактивация которых осуществляется путем изменения характера метилирования.

Эти результаты хорошо согласуются с данными морфометрического анализа, свидетельствующими об увеличении размеров С-блоков хромосом 1, 9 и 16 в экстраэмбриональных тканях у плодов человека в первом триместре беременности.

Определенное сходство между хорионом и опухолями в отношении параметров клеточного цикла, предрасположенности к гетероплоидии, уровню метилирования позволяет высказать предположение, что некоторые онкогены, многие из которых, как известно, играют важную роль в эмбриогенезе, активны и в клетках хориона. По крайней мере, часть таких генов локализована в гетерохроматине. Можно надеяться, что полная расшифровка первичной структуры генома человека, включая и области гетерохроматина, идентификация всех генов и выяснение их функций позволят решить проблему гетерохроматина, в том числе получить ответ на вопрос о наличии в его составе структурных генов.

Использование моноклональных антител к 5-метилцитозину позволило обнаружить и описать новый тип сегментации метафазных хромосом человека, который мы назвали М-сегментацией. Предварительные данные, полученные на зародышах человека, свидетельствуют о наличии количественных и качественных различий паттернов метилирования метафазных хромосом на разных стадиях эмбриогенеза человека. Характерным для эмбрионов ранних доимплантационных стадий является гемиметилированность хромосом. Дефинитивный рисунок метилирования хромосом начинает определяться только на стадии морулы — ранней бластоцисты. У плодов 20–24 недель развития отмечаются существенные отличия паттерна метилирования многих локусов от гомологичных им локусов хромосом из лимфоцитов взрослых индивидуумов. Не исключено, что выявленные различия в характере метилирования метафазных хромосом и их гомологичных сегментов отражают существенные особенности функциональной активности генов этих сегментов на разных стадиях онтогенеза.

Полученные данные, основанные на визуальной оценке интенсивности флуоресценции, носят ориентировочный характер. Для точной оценки таких различий необходимо не только сравнение денситометрических профилей М-рисунка, но и насыщенность физических карт, а также сведения об экспрессионных профилях соответствующих клеток на разных стадиях онтогенеза.

Дальнейшие углубленные исследования особенностей паттернов метилирования метафазных хромосом в разных тканях и на разных стадиях эмбриогенеза могут дать ценную новую информацию об особенностях функции генома в эмбриогенезе человека.

ГЛАВА 11 ГОРИЗОНТЫ ЦИТОГЕНЕТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Введение

Цитогенетика развития человека — сравнительно новое направление на стыке многих фундаментальных (генетика, молекулярная биология, эмбриология, физиология) и прикладных (медицинская генетика, пренатальная диагностика, репродуктология) направлений современной науки. Задачи цитогенетики развития тесно смыкаются с проблемами фенотипики, общей генетики и биологии развития. Качественное своеобразие цитогенетики эмбрионального развития на современном этапе определяется не только доступностью эмбрионального материала и гамет человека практически на любой стадии развития, но и огромными успехами клеточной биологии и цитогенетики в изучении тонкой структуры хромосом и их поведения в митозе и в мейозе, бурным развитием методов молекулярной цитогенетики. Наконец, огромные перспективы для цитогенетики открывает завершение расшифровки генома человека и картирование непосредственно на хромосомах генов, число которых к концу 2004 года достигло 15 000. Последнее обстоятельство позволяет уже сегодня говорить о *цитогеномике эмбрионального развития*, имея при этом в виду исследование надмолекулярных (хромосомных) механизмов регуляции генной активности в процессе онтогенеза.

Сравнительно небольшой объем информации, приведенной в предыдущей главе, отчасти объясняется тем, что, по убеждению авторов, реальные сведения по цитогенетике эмбрионального развития человека могут быть получены лишь при использовании прямых хромосомных препаратов из гамет или тканей развивающихся зародышей. Использование для этих целей культивируемых клеток не позволяет объективно

оценить структурно-функциональные особенности интерфазного ядра и хромосомного аппарата, которые в условиях *in vitro* всегда претерпевают значительные изменения. Не случайно основные результаты по цитогенетике эмбрионального развития млекопитающих были получены на прямых хромосомных препаратах в условиях модельных экспериментов на лабораторных мышах, главным образом, на мышах с различными хромосомными транслокациями [11, 14, 18, 21, 56, 249, 250, 251, 380].

В данной главе проведено сравнение основных положений цитогенетики эмбрионального развития млекопитающих с таковыми у человека, намечены наиболее актуальные направления дальнейших исследований, представляющих несомненный интерес для фундаментальной науки и практической медицины.

Нам представляется, что существенный прогресс в цитогенетике (цитогеномике) эмбрионального развития человека может быть достигнут при решении следующих основных вопросов.

- Как происходит формирование дефинитивной трехмерной структуры ядра зародыша после оплодотворения яйцеклетки? Каковы хромосомные аспекты клеточной дифференцировки?
- Наблюдается ли при оплодотворении и на первых делениях дробления феномен конъюгации гомологичных хромосом?
- Что представляют собой паттерны метилирования хромосом в провизорных органах и собственно в тканях плода на разных стадиях эмбриогенеза?
- Каковы особенности метилирования гетерохроматиновых районов?
- Какова функциональная роль гетерохроматина?
- Имеются ли различия в функциональной активности гомологичных хромосом?
- Каков генез спонтанных хромосомных нарушений у доимплантационных зародышей?
- Какие факторы определяют феногентику хромосомных аномалий?

Ответы на эти вопросы имеют принципиальное значение для цитогеномики эмбрионального развития человека. Для удобства изложения они могут быть подразделены на 5 групп: 1) особенности структурно-функциональной организации хромосом в развитии, 2) гетерохро-

матин, 3) метилирование ДНК, 4) цитологические факторы регуляции геной активности, 5) феногенетика хромосомной патологии. В заключительном разделе главы будут кратко рассмотрены перспективы диагностики, профилактики и лечения хромосомных болезней.

11.1. Особенности структурно-функциональной организации хромосом на начальных стадиях развития

Известно, что мужской пронуклеус несколько крупнее женского, а метафазные хромосомы из спермия, как правило, менее спирализованы, чем женские, что позволяет говорить о гетероцикличности родительских наборов хромосом в 1-м делении дробления (см. главу 1). На стадии двух бластомеров гетероцикличность гомологов мужского и женского пронуклеусов уже исчезает. При этом, как показано в эксперименте, на единичных метафазных пластинках 1-го деления дробления отмечается парное расположение гомологов, то есть вытянутые деспирализованные хромосомы мужского пронуклеуса прилежат непосредственно к более спирализованным (коротким) гомологам женского пронуклеуса [144, 190]. Представить случайный вариант такого парного расположения всех гомологов вряд ли возможно. Интересно, что число гетерохроматиновых С-блоков в интерфазных ядрах мышинных зародышей на стадии двух бластомеров примерно соответствует диплоидному ($2n = 40$), тогда как на стадии четырех бластомеров их число уменьшается почти вдвое и становится таким, как в дефинитивном интерфазном ядре [144]. Высказано предположение, что данный феномен, напоминающий спаривание гомологов в 1-й метафазе мейоза, свидетельствует о неслучайном расположении гомологичных хромосом на начальных этапах формирования архитектоники ядра и, по-видимому, имеет важное значение для нормальной функции хромосом на последующих стадиях развития [11]. Отметим, однако, что парное расположение гомологов в зиготе пока было зарегистрировано только у лабораторных мышей. Исследование поведения хромосом в 1-м делении дробления у зародышей человека не проводилось. Поэтому неизвестно, в какой мере данный феномен имеет универсальный характер. Эти наблюдения позволяют предполагать, что у млекопитающих и, возможно, у человека основные события, связанные с формированием дефинитивного клеточного ядра, определяющие все дальнейшее

развитие зародыша происходят в течение первых двух делений дробления.

Мы вернемся к этому феномену при рассмотрении проблемы феногенетики хромосомных аномалий (см. раздел 11.5).

В настоящее время методом многоцветной гибридизации *in situ* с использованием цельнохромосомных проб проводится изучение 3-мерного положения хромосом в интерфазном ядре [562]. Установлено, что хромосомы расположены в ядре не случайно, а занимают характерные для каждой пары территории. Такое взаиморасположение хромосом в ядре получило название *функциональной компартиментализации* [490]. Координаты хромосомных территорий в интерфазном ядре зависят от длины хромосомы, ее структуры, времени репликации и функциональной активности [680]. Так, хромосомы с высокой концентрацией генов (например, хромосома 19) обычно занимают центральное положение, а хромосомы примерно того же размера с низкой концентрацией генов (хромосома 18) располагаются по периферии интерфазного ядра [702]. Пока такие исследования ограничены только клетками взрослого организма. Архитектоника ядра у эмбрионов остается практически неизученной. Отсутствует информация и о том, как меняется взаиморасположение хромосом в ядрах зародыша человека в разных зачатках, тканях и на разных стадиях развития. Между тем, нет сомнения в том, что такая динамика, безусловно, существует, и она важна для обеспечения нормальной функции генома, то есть для транскрипции генов. Связь хроматина с внутренней ядерной мембраной, формирование петель ДНК транскрипционно активного хроматина, их взаимодействие с ядерным матриксом привлекает внимание многих исследователей и позволяет приблизиться к пониманию функции генома с позиции молекулярной цитогенетики [323, 348, 436].

Таким образом, комплексное изучение динамики микроархитектоники клеточного ядра в процессе онтогенеза, начиная с самых ранних стадий развития, с использованием методов молекулярной цитогенетики, электронной микроскопии, биохимии и иммуногистохимии имеет принципиально важное значение для понимания функций генома, экспрессии генов и проблем феногенетики в процессах нормального и патологического развития зародышей человека.

Основным цитологически определяемым признаком начала функциональной активности хромосом в эмбриогенезе является появление

ядрышек, которые хорошо визуализируются в интерфазных ядрах и на метафазных хромосомах после окраски азотнокислым серебром (см. главу 10 и Приложение). Опыты на лабораторных мышах доказывают, что кластеры рибосомных генов становятся функционально активными на стадии поздних 2 бластомеров и выявляются на всех стадиях клеточного цикла, начиная со стадии 4 бластомеров [171]. Важные сведения об асинхронности транскрипции главных рибосомных генов в норме и у партеногенетических зародышей были получены в экспериментах на мышах и крысах с использованием оокадаевой кислоты, вызывающей преждевременную конденсацию хромосом [59]. Точные данные о стадии эмбриогенеза человека, на которой включается транскрипция рибосомных генов, пока отсутствуют. Наши предварительные результаты свидетельствуют о том, что на хромосомах доимплантационных зародышей человека аргентофильные ядрышкообразующие районы не определяются. Гранулы азотнокислого серебра фиксировались по длине хромосом, иногда концентрировались в теломерных районах, но не выявляли аргентофильные белки в типичных районах локализации кластеров рибосомных генов. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения качественных и количественных особенностей экспрессии рибосомных генов у нормальных и патологических зародышей человека ранних стадий развития.

Применение оокадаевой кислоты, как было показано в экспериментах, с успехом может быть использовано и для выявления анеуплоидных зародышей и выяснения их происхождения [55, 59]. Благодаря возможности визуализации хромосом на стадии G1 в мужском и женском пронуклеусах и во 2-м полярном тельце впервые оказались доступными не только точная регистрация числа хромосом, но и определение родительского происхождения анеуплоидии, а также оценка частоты пресегрегации хромосом, то есть возникновения в первом делении мейоза непарных хроматид. Такие исследования, к сожалению, пока не были проведены на зародышах человека. Поэтому информацию о частоте анеуплоидии у ранних зародышей человека и вкладе отцовского и материнского геномов в возникновение структурных и численных хромосомных аномалий пока следует рассматривать только как ориентировочную.

Возможно, применение этого цитогенетического приема (оокадаевая кислота) позволит прояснить проблему, связанную с необычно высокой

(38–46%) частотой мозаиков с трисомией или моносомией хромосом среди зародышей человека 4-го дня развития [388] и высокую частоту мозаичной моносомии у ранних спонтанных абортос [100, 139]. Данный подход может найти применение и для проверки интересной гипотезы М. Голубовского о постзиготической диплоидизации у триплоидных зигот как источнике необычных вариантов анеуплоидии, включая мозаицизм, химеризм и близнецовость у эмбрионов человека [445].

Важные результаты о структурно-функциональной организации хромосом на ранних стадиях развития были получены и в серии экспериментов с использованием различных рестрикционных эндонуклеаз. В частности, таких, которые выявляют Alu-повторы, либо метилированные участки хромосом (см. раздел 11.2) [143]. Весьма примечательным в этой серии исследований явилось и установление такого любопытного факта, что частота сестринских хроматидных обменов в хромосомах дробящихся зародышей в несколько раз выше, чем в клетках зародышей постимплантационных стадий или в клетках взрослых животных. Высказано интересное предположение о связи частоты СХО с уровнем метилирования ДНК в эмбриогенезе [143].

Таким образом, результаты экспериментов на дробящихся мышечных зародышах свидетельствуют о том, что структура хромосом закономерно меняется в ходе дробления и отличается от таковой в дефинитивных соматических клетках. Естественно, эта информация важна для выяснения надмолекулярных (хромосомных) механизмов контроля ранних стадий развития, а потому представляет большой интерес для цитогенетики (цитогеномики) эмбриогенеза человека.

11.2. Структурная и функциональная роль гетерохроматина

Важная роль в формировании и поддержании архитектоники клеточного ядра принадлежит *гетерохроматину*. Последний представляет собой блоки высокоповторяющихся последовательностей ДНК, различных по протяженности и нуклеотидному составу. Часть из них — *сателлитная ДНК околоцентромерных районов* — расположена в области центромеры (*структурный гетерохроматин*). На ее долю приходится 2–3% всей ДНК клетки. Особенно значительные по размерам и числу повторов блоки сатДНК находятся в прицентромерных районах хромосом 1, 9 и 16. Другие гетерохроматиновые блоки, «рас-

сеянные» по длине хромосомы представляют *интеркалярный гетерохроматин*, на долю которого приходится до 45–50 % всей ДНК клетки. Это так называемая «лишняя» или «эгоистическая» ДНК, назначение которой в ядре остается загадочным. Наконец, различают еще *факультативный гетерохроматин*, представленный неактивной гетерохроматизированной X-хромосомой в соматических клетках с женским карิโอотипом XX, идентифицируемый цитологически в интерфазном ядре как тельце Барра, а также в половом XY-пузырьке в сперматоцитах на стадии пахитены.

Ранее было принято рассматривать конститутивный (структурный) гетерохроматин как функционально инертный компонент генома эукариот, в том числе и человека. В настоящее время это понятие претерпевает серьезные изменения. Все больше появляется данных, подтверждающих известную гипотезу А. А. Прокофьевой-Бельговской о важной роли гетерохроматина не только как структурного компонента генома, но и как возможного регулятора его активности [158]. Существенную роль в этом сыграли исследования последних лет, касающиеся тонкой структурно-функциональной организации гетерохроматина в ядре, его роли в поддержании микроархитектоники интерфазных хромосом (*хромосомных территорий*), участие в процессах рекомбинации и образовании межхромосомных перестроек, а также в регуляции генной экспрессии [779, 824]. Подробно изучены и биомеханизмы репрессии гетерохроматина и расположенных в нем структурных генов [61, 398]. В частности, установлено, что триггерная роль в репрессии гетерохроматина принадлежит коротким (20–23 п.о.) некодирующим двухцепочечным молекулам РНК (малые интерферирующие РНК — siRNA), которые синтезируются на коротких повторяющихся последовательностях. Присоединение этих молекул РНК к ДНК индуцирует каскад биохимических реакций, приводящих к метилированию цитозинового остатков CpG-динуклеотидов, гипоацетилированию гистонов, определяющих нуклеосомную организацию ДНК, и присоединение к этим фрагментам особых белковых комплексов, полностью изолирующих ДНК от действия транскрипционных факторов и, таким образом, предотвращающих транскрипцию генов [779].

Вместе с тем, если роль гетерохроматина в стабилизации центromеры, в поддержании 3-мерной пространственной архитектоники ядра и в обеспечении точности процессов рекомбинации и хромосомных

перестроек уже может считаться доказанной, то значение гетерохроматина в регуляции генной активности пока остается в области предположений и спекуляций.

Исключение, пожалуй, составляет только факультативный гетерохроматин X-хромосомы, механизмы инактивации которой изучены достаточно подробно [587]. В опытах на мышах установлено, что инактивация одной X-хромосомы у особей женского пола происходит еще во время дробления зародыша и, по-видимому, знаменует собой первичную дифференцировку функционально и морфологически однородных бластомеров на клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) и клетки трофэктодермы (см. главу 1). Непосредственно контролирует инактивацию ген XIST, расположенный в центре инактивации X-хромосомы XIC – Xq13.1. Экспрессия этого гена приводит к синтезу специфического РНК-продукта размером 13 000 п. о., который быстро распределяется по всей X-хромосоме и является триггером таких реакций как инактивация ДНК (метилирование цитозиновых нуклеотидов), стабилизация гистонов (метилирование лизинов, гипоацетилирование), посадка на хроматин специфических белковых комплексов, стабилизирующих спирализацию (гетерохроматизацию) ДНК и препятствующих действию факторов транскрипции (см. также раздел 10.2.2). Существенно, что у мышей и, по-видимому, у человека процесс инактивации X-хромосомы в трофэктодерме и ее производных, в том числе в клетках цитотрофобласта плаценты неслучайный и затрагивает почти исключительно X-хромосому отцовского происхождения, то есть поступившую с геномом спермия. В клетках ВКМ и ее производных этот процесс рандоминизирован, то есть одинаково часто инактивируются отцовская или материнская X-хромосомы. Следовательно, все особи женского пола у лабораторных млекопитающих и у человека являются природными мозаиками по генам X-хромосомы, что имеет существенное значение в половом диморфизме проявления мутаций генов X-хромосомы [42]. Важно, однако, подчеркнуть, что основные сведения об особенностях инактивации X-хромосомы в эмбриогенезе пока получены в модельных экспериментах на мышах. Существуют данные, что у зародышей человека на стадии 4–8 бластомеров наблюдается экспрессия гена XIST только на отцовской X-хромосоме. Это дает основание предполагать, что в производных трофобласта у человека, так же как и у лабораторных мышей происходит избирательная гетерохроматизация (инактивация) именно отцовской

X-хромосомы [573]. На каких стадиях происходит инактивация X-хромосомы в эмбриогенезе человека окончательно не выяснено и заслуживает специального анализа.

Характерным для интеркалярного гетерохроматина, сравнительно небольшие по длине фрагменты которого [617] рассеяны по хромосомам, является метилирование цитозиновых остатков CpG-динуклеотидов в ДНК и лизина 9 в гистоне H3. Перманентная репрессия генов, прилежащих к интеркалярному гетерохроматину, достигается за счет специального комплекса белков, которые обладают гистон-деацетилазной активностью и способствуют метилированию лизина 9 в гистоне H3 [824].

Роль интеркалярного гетерохроматина в регуляции активности генов детально изучена на политенных хромосомах дрозофилы. Именно эксперименты на дрозофиле позволили прийти к заключению, что гетерохроматин играет важнейшую роль в регуляции времени экспрессии генов, скорости клеточного деления, роста и даже дифференцировки, то есть контролирует все основные временные параметры индивидуального развития [61, 84]. Каким образом регулируется активность генов у млекопитающих и у человека, какова роль молекулярных и надмолекулярных механизмов, а также гетерохроматина в реализации программы индивидуального развития остается малопонятным. Интенсивные исследования этих актуальных вопросов генетики и цитогенетики развития продолжают [108, 348, 550].

Известно, что области гетерохроматина сильно обеднены генами. Существование структурных генов в гетерохроматине до настоящего времени подвергается сомнению. Области, богатые интеркалярным гетерохроматином, такие как G-диски метафазных хромосом, содержат в десятки раз меньше генов, чем их концентрация в эухроматине (R-дисках) [161, 258]. Вместе с тем, присутствие в C-гетерохроматине структурных генов ранее было показано у дрозофилы [712] и пшеничной полевки [807]. Наши эксперименты с ник-трансляцией *in situ* на метафазных хромосомах плода человека после обработки ДНКазой I или метил-чувствительной рестриктазой HpaII, а также результаты опытов с антителами к метилцитозину (см. главу 10) доказывают деметилированное состояние C-гетерохроматина в хромосомах 1, 9 и 16. На прямых препаратах из клеток хориона и плаценты деметилирование особенно выражено на одном из гомологов этих хромосом. Эти

наблюдения в сочетании с литературными данными дают достаточно оснований для предположения о наличии структурных генов в С-гетерохроматине этих хромосом и у человека. Более того, по аналогии с гетерохроматиновыми генами дрозофилы и пашенной полевки, можно предполагать, что эти гены контролируют ранние стадии эмбриогенеза человека. По завершении этих стадий происходит их необратимое выключение в соответствии с ранее описанным механизмом стабилизации (инактивации) гетерохроматина (см. выше). Уместно отметить, что согласно прямым цитогенетическим исследованиям зародышей человека с хромосомными аномалиями также получены данные, позволяющие сделать вывод о возможной генетической активности гетерохроматиновых районов хромосом в мейозе. Правда, при этом гетерохроматину отводится важная роль не как месту локализации ранних генов, а, скорее, как фактору, детерминирующему пространственную архитектуру ядра [117].

Таким образом, функции гетерохроматина в эмбриогенезе, как, впрочем, проблема гетерохроматина вообще, все еще далеки от своего решения. Более того, эта загадочная часть геномной ДНК в эмбриогенезе человека только начинает изучаться. Вместе с тем, нет сомнения, что исследования гетерохроматина представляют собой одно из магистральных направлений в цитогенетике развития человека.

11.3. Метилирование ДНК в эмбриогенезе

В предыдущих разделах мы неоднократно обращались к процессу метилирования ДНК как к универсальному механизму регуляции генной активности. Напомним, что согласно наиболее общепринятой точке зрения, выключение работы структурных генов происходит в результате метилирования CpG-нуклеотидов в промоторных частях гена, вследствие чего становится невозможной посадка на ДНК фермента РНК-полимеразы II, и процесс транскрипции полностью блокируется [84]. Метилирование лежит в основе таких важных биологических феноменов как геномный импринтинг, аллельное исключение, инактивация X-хромосомы, оно играет важную роль в процессах онкогенеза [121, 128, 746, 883]. Исследовать метилирование на цитологическом уровне можно при помощи реакции ник-трансляции с использованием метил-зависимой эндонуклеазы HpaII (см. главу 10) либо путем гистохимического выявления участков хромосом, насыщенных метилиро-

ванными CpG-последовательностями, с помощью специфических антител к метилцитозину (см. главу 10) [307]. В результате проведенных исследований уже получены ориентировочные данные, свидетельствующие о следующем: 1) в С-гетерохроматине некоторых хромосом могут находиться структурные гены, 2) характер метилирования хромосом в клетках хориона (плаценты) отличается от такового в клетках собственных эмбриональных тканей, 3) паттерны метилирования гомологичных хромосом в клетках плаценты могут быть разными. Последние две находки позволили предполагать, что активность хромосом (генов) в хорионе отлична от таковой в собственно эмбриональных тканях, и что функции материнских и отцовских хромосом в клетках провизорных органов, прежде всего, в плаценте, отличаются. Все эти предположения имеют большой научный и практический интерес. Их прямая проверка с помощью других методов и подходов, особенно методами молекулярной биологии (например, путем изучения соответствующих РНК-последовательностей или белковых продуктов, синтезируемых генами метилированных и неметилированных участков хромосом) является актуальной.

Следует обратить внимание, что использование гистохимического метода детекции метилированных участков хромосом началось сравнительно недавно. До настоящего времени мало известно о чувствительности данного метода. Считается, что этим методом нельзя выявлять единичные метилированные CpG-островки в промоторах структурных генов [307]. Неясно, однако, при какой плотности метилированных цитозинов (CpG-островков) сигнал детекции становится положительным. Тем не менее, согласно уже полученным данным (см. главу 10) окраска метафазных хромосом из культивируемых лимфоцитов крови с применением антител к метилцитозину позволяет получить дифференциальную окраску, отличную от ранее хорошо известных G-, R-, Q-, C-, T-рисунков, получаемых стандартными методами. Данное обстоятельство позволяет говорить о наличии нового, специального метода дифференциальной окраски хромосом, который позволяет выявлять кластеры метилированной ДНК — М-сегментацию [71]. Известно также, что хромосомы дробящихся зародышей млекопитающих обнаруживают весьма характерную окраску, при которой типичные М-сегменты располагаются только в одной хроматиде (родительской) и отсутствуют в другой (дочерней) [307]. Такое расположение полос свидетельствует о задержке метилирования ДНК дочерних

хроматид на начальных стадиях развития. Гипометилирование одной из хроматид (гемиметилирование) отмечено нами и у доимплантационных зародышей человека. Другие важные находки при изучении паттернов метилирования хромосом дробящихся зародышей человека касаются наличия существенных различий в метилировании гомологичных хромосом и отсутствия метилирования крупных блоков гетерохроматина хромосом 1, 9, 16. В настоящее время имеются данные, что у дробящихся зародышей млекопитающих функционально активна почти половина всех структурных генов (около 15 000) [760]. Возможно, гипометилированное состояние генома как раз и отражает высокую транскрипционную активность генов ранних зародышей человека. Неожиданным следствием такого «раскрытия» хроматина у доимплантационных зародышей мышей, как показали молекулярные исследования, явилась массовая транскрипция эндогенных, то есть находящихся в составе ДНК хромосом и особенно широко представленных в гетерохроматине вирусоподобных последовательностей — ретротранспозонов. Более того, оказалось, что в ооцитах и у дробящихся зародышей происходит массовое перемещение ретротранспозонов по геному и их включение в промоторные области и даже в состав первых экзонов многих структурных генов [760]. Эти интересные факты дают основание рассматривать гипометилирование хроматина, транскрипцию и перемещение по геному ретротранспозонов, их интеграцию в структурные гены как цепь последовательных событий, необходимых для активации генома зародыша, формирования первичного эмбрионального транскриптома и начала реализации наследственной программы индивидуального развития.

Таким образом, деспирализации хромосом и гипометилированию ДНК принадлежит ключевая роль в запуске программы индивидуального развития. Эти принципиально важные наблюдения позволяют считать, что обнаруженные в наших исследованиях различия паттернов метилирования некоторых идентичных сегментов гомологичных хромосом, а также паттернов метилирования хромосом эмбриобласта и цитотрофобласта могут указывать на их большую роль в регуляции генной активности в раннем эмбриогенезе человека. Дальнейшее углубленное изучение этих новых цитогенетических феноменов с применением современных молекулярных и молекулярно-цитогенетических методов исследования представляет несомненный интерес для понимания особенностей функции генома на доимплантационных стадиях развития.

В заключение, уместно обратить внимание на то, что согласно разработанному и уже частично реализуемому в ряде лабораторий мира эпигеномному проекту предполагается новая программа по изучению общегеномного метилирования всех генов человека. В рамках этой программы уже составлен паттерн метилирования HLA-локуса, где картированы главные гены гистосовместимости. Ограничена ли эта программа только клетками различных тканей взрослого организма или будет включать паттерны метилирования генов в эмбриогенезе человека пока неясно.

Таким образом, несмотря на ранее отмеченные ограничения, дальнейший анализ паттернов метилирования метафазных хромосом в различных тканях зародыша и на разных стадиях развития является, безусловно, перспективным направлением цитогенетики (цитогеномики) эмбрионального развития человека.

11.4. Цитологические факторы регуляции активности генов в эмбриогенезе

Как следует из рассмотренного выше материала, на современном уровне наших знаний уже можно выделить следующие механизмы регуляции функции генов на хромосомном уровне:

- Архитектоника ядра, определяющая пространственное расположение хромосом и, по-видимому, их функции.
- Конститутивный гетерохроматин, который играет важную роль в дислокации хромосом в интерфазном ядре и, возможно, непосредственно регулирует работу ряда «ранних» генов.
- Интеркалярный гетерохроматин, определяющий связь хромосом с ядерным матриксом, с внутренней ядерной мембраной и, возможно, непосредственно вовлеченный в надмолекулярную организацию работы генома через механизмы избирательной спирализации — деспирализации.
- Факультативный гетерохроматин X-хромосомы, определяющий неактивное состояние генов этой хромосомы.
- Метилирование ДНК, которому принадлежит решающая роль в дифференциальной экспрессии генов и, прежде всего, генов «домашнего хозяйства». Метилирование ДНК прямо связано с механизмами компактизации — декомпактизации хроматина и, соответственно, с репрессией — дерепрессией генов.

Другие феномены, важные для цитогенетики эмбрионального развития человека, это *хромосомный импринтинг* и *однородительская дисомия*.

Хромосомный (геномный) импринтинг — дифференциальная экспрессия генов, определяемая тем, от кого из родителей (матери или отца) они унаследованы [19, 20, 566]. В участках генома, подверженных импринтингу, экспрессируется только одна аллель — отцовская или материнская. Геномный импринтинг — яркий пример эпигенетической наследственности, то есть наследственности, обусловленной надмолекулярной модификацией ДНК, не затрагивающей ее первичную нуклеотидную последовательность [43].

Данные по геномному импринтингу у человека суммированы на конференции National Institute of Child Health (USA) [893]. Они подробно рассмотрены в ряде отечественных обзоров и сборниках [120, 121, 128].

Как уже отмечалось в главе 10, доказано, что ведущая роль в реализации процесса импринтинга принадлежит ацетилированию гистонов и метилированию ДНК. Детали процесса импринтинга в родительских половых клетках, его сохранение в клетках эмбриона и роль в регуляции процессов экспрессии генов, долгое время оставались неясными. Несмотря на то, что молекулярные механизмы импринтинга до настоящего времени окончательно не установлены, в последние годы в изучении феномена геномного импринтинга достигнуты серьезные успехи. В частности, определены ДНК-последовательности, играющие важную роль в контроле импринтинга, установлено время появления и элиминации импринтов в половых клетках, описана динамика метилирования импринтированных генов в пре- и постнатальном периодах онтогенеза, обнаружена кластерная локализация импринтированных генов в геноме, показана асинхронность репликации импринтированных генов.

В последние годы достигнут большой прогресс в идентификации импринтированных генов. В настоящее время у человека уже известно свыше 40 таких генов и предполагается, что их число может достигать 500 [402]. В настоящее время импринтированные гены обнаружены во многих хромосомах человека — 1, 5–7, 11, 13, 15, 19, 20. Характерной особенностью импринтированных генов оказалась их кластерная организация. Крупные кластеры импринтированных генов обнаружены на хромосомах 7, 11, 14 и 15.

Изменения эпигенотипа, приводящие к ослаблению или нарушению установившегося паттерна импринтинга, неблагоприятно сказываются на эмбриональном развитии и могут быть причиной различных патологических состояний и болезней в постнатальном периоде.

В частности, ранее в модельных экспериментах на мышах с хромосомными транслокациями было установлено, что патологический эффект геномных мутаций проявляется по-разному и зависит от того, какая родительская хромосома (отцовская или материнская) находится в избытке или, наоборот, в дефиците [14, 18, 20, 21, 249, 250, 251].

Известно, что подавляющее большинство зародышей с хромосомными аномалиями, в том числе с дисбалансом хромосом, совместимым с постнатальным развитием (моносомия X — синдром Шерешевского–Тернера, трисомия 21 — болезнь Дауна, трисомии 13 и 18), нежизнеспособно еще во внутриутробном периоде. Так, установлено, что отсутствие одной X-хромосомы, которое вполне совместимо с постнатальной жизнью, в действительности летально для 99% эмбрионов. Можно предполагать, что отчасти такой эффект связан с нарушением баланса импринтированных генов (см. раздел 11.5).

Одним из частых проявлений нарушения процессов импринтинга и дисбаланса импринтированных генов может быть *однородительская дисомия*. Последняя определяется как состояние, при котором индивидуум наследует обе копии хромосомы от одного из родителей и не содержит в геноме соответствующего гомолога от другого родителя. Однородительская дисомия может быть полной, когда затрагивается целая хромосома, либо частичной (сегментной), когда это касается только хромосомного фрагмента (см. также главы 7 и 9). Частота ОРД составляет в среднем 1 на 3000 зигот. Она может возникнуть в результате потери одной хромосомы у зародыша с трисомией при условии сохранения двух других хромосом одного из родителей, удвоения единственной непарной хромосомы при моносомии, митотической рекомбинации между хроматидами, комплементарности гамет — нуллисомия в одной и дисомия в другой гамете, участвующих в оплодотворении. Естественно, что в каждом из таких вариантов доза всех генов остается нормальной. Единственным отличием от нормы в случае гетеро-ОРД (см. главу 7) может быть необычный паттерн импринтинга, то есть наличие двух однотипных вариантов импринтинга по женскому или мужскому типу. Соответственно,

характер патологического эффекта будет определяться тем, какие импринтированные гены находятся в избытке или в дефиците. Для нормального эмбриогенеза, как показали первооткрыватели данного феномена Д. Солтер, Дж. МакГрат и А. Сурани, всегда необходимо наличие двух комплементарно импринтированных аллелей — отцовской и материнской [612]. Число уже известных болезней геномного импринтинга, связанных с ОРД, составляет около 10 и продолжает увеличиваться [121]. Сведения о том, как сказывается ОРД на эмбриональном развитии, пока весьма ограничены и неоднозначны. Однако не вызывает сомнения, что ОРД в клетках плаценты может быть причиной нарушения ее развития и приводить к плацентарной недостаточности и задержке внутриутробного развития плода.

Цитогенетическая диагностика ОРД затруднена. Она возможна только в отдельных случаях при наличии соответствующих хромосомных маркеров (необычные по размерам спутники, блоки гетерохроматина). Основная диагностика ОРД проводится молекулярными методами с использованием высокоповторяющихся (высокополиморфных) ДНК-маркеров [121]. Заподозрить наличие ОРД в условиях пренатальной диагностики возможно при наличии мозаицизма хромосом, ограниченного плацентой, при наличии у плода Робертсоновской транслокации (центромерного слияния хромосом), унаследованной от одного из родителей, при задержке развития плода и плаценты неясной этиологии (см. главы 7 и 9).

Таким образом, геномный импринтинг не связан с изменениями первичной последовательности ДНК и является следствием эпигенетических изменений генома. Наличие на многих хромосомах человека, особенно на хромосомах 7, 11, 14 и 15 кластеров импринтированных генов, обнаруживающих различную экспрессию при передаче зародышу через мужские или женские гаметы, играет важную роль в патологии ante- и постнатального развития. Цитологическую основу геномного импринтинга составляет одnorodительская дисомия.

11.5. Феногенетика хромосомной патологии

Представляет собой одну из наиболее сложных и малопонятных проблем цитогенетики (цитогеномики) эмбрионального развития человека. Почему дисбаланс одних хромосом всегда летален уже на ранних стадиях, тогда как других совместим с завершением эмбриогенеза

и даже с постнатальным развитием? Почему хромосомные нарушения, приводящие к типичным хромосомным болезням, в подавляющем большинстве случаев подвергаются элиминации еще до рождения? Чем объяснить сходство клинических проявлений многих хромосомных болезней? Что является непосредственной причиной гибели зародышей с хромосомными aberrациями? Эти и многие другие вопросы фенотипики хромосомной патологии пока не имеют доказательных ответов. Нам представляется, что причина этого кроется, прежде всего, в многообразии нарушений функций генома в условиях хромосомного дисбаланса, в многообразии уровней живого организма, на которых разворачиваются эти нарушения (молекулярный, клеточный, тканевой, организменный).

Каждая хромосома представляет собой сложную, эволюционно сложившуюся, целостную иерархическую систему, состоящую из многих сотен структурных и регуляторных генов, разделенных различными классами повторяющихся последовательностей, назначение которых пока неизвестно. Эта система может нормально функционировать только в условиях правильной трехмерной организации ядра, четко скоординированной и сбалансированной работы всего генома.

Естественно предполагать, что избыток или дефицит целой хромосомы неизбежно приводит к дисбалансу многих структурных генов и регуляторных последовательностей (факторов транскрипции), действующих не только в пределах одной хромосомы (*cis-эффект*), но и на гены других хромосом, которые представлены нормальным диплоидным числом (*trans-эффект*). Действительно, молекулярный анализ зародышей с частичной трисомией в условиях экспериментов позволил установить, что экспрессия генов в «избыточном» фрагменте хромосом в среднем в 1,2 раза превышает контрольный уровень, тогда как генов диплоидного фрагмента снижается и составляет 0,9 от контроля [783].

Таким образом, не вызывает сомнения, что на молекулярном уровне первым и основным результатом численных хромосомных aberrаций или несбалансированных хромосомных перестроек должно быть *нарушение дозы генов*. Действительно, эффект дозы генов, измеряемый по количеству генопродуктов (белка, РНК) достаточно четко показан при дисбалансе многих хромосом. Каждый из этих генопродуктов, в свою

очередь, может выступать в качестве триггера или шунта различных биохимических реакций и в результате избытка или дефицита приводит к нарушениям различных жизненно важных метаболических путей. Можно предполагать, с некоторыми оговорками, что специфические нарушения и аномалии, характерные для многих хромосомных болезней как раз и обусловлены дисбалансом уникальных структурных генов.

Еще менее предсказуем и многообразен должен быть эффект дозы регуляторных генов, в частности, генов-факторов транскрипции, действие которых направлено на регуляцию функций сразу многих генов. В последнее время в генетике развития особенно популярно представление о наличии в клетке генов-господ и генов-рабов [84]. К первой группе относятся семейства генов-регуляторов, такие как факторы транскрипции типа кластеров генов HOX, SOX, PAX, продукты экспрессии которых, небольшие по размерам белки (около 200 аминокислот), благодаря наличию специальных аминокислотных последовательностей — гомеодоменов, способны соединяться с регуляторными элементами многих структурных генов (генов-рабов), индуцируя или подавляя их экспрессию.

Согласно мнению одного из авторов этой теории нобелевского лауреата Вальтера Геринга, сложнейшая морфогенетическая реакция, завершающаяся формированием целого органа, может быть запущена в ходе эмбрионального развития одним геном [84]. Естественно, что дисбаланс таких генов должен приводить к нарушению экспрессии сразу многих генов различных метаболических путей, а также генов, ответственных за нейроэндокринный статус организма, что *a priori* предполагает выраженный плейотропный (многообразный) эффект дисбаланса таких генов. Действительно, поражение сразу многих различных систем, органов и тканей при дисбалансе различных хромосом является типичным проявлением многих хромосомных болезней.

Важная роль в феногенетике хромосомных аномалий, по-видимому, принадлежит и коротким повторяющимся ДНК-последовательностям в интронах и в межгенных спейсерах, на которых осуществляется синтез особых малых ядерных РНК, в частности, двухцепочечной интерферирующей РНК (siRNA), размером всего 20–25 п. о. и одноцепочечной микро РНК (miRNA), размером 15–20 п. о. Малые ядерные РНК, согласно последним данным, играют решающую роль в регуляции

процессов трансляции непосредственно на уровне рибосом и в процессах гетерохроматизации, т. е. в процессах репрессии — дерепрессии структурных генов [557]. Избыток таких РНК или их дефицит должен приводить к искажению работы многих генов гомологичных, а возможно, и негомологичных хромосом или хромосомных сегментов, вовлеченных в хромосомные аберрации.

Учитывая важность архитектоники интерфазного клеточного ядра, наличие вполне определенных территорий для каждой хромосомы, четкой функциональной компарментализации для осуществления правильной работы генома (см. раздел 11.1) логично предполагать, что хромосомный дисбаланс должен приводить к существенным поломкам внутриядерной структуры, что должно отрицательно сказываться на работе всего генома, а не только отдельных хромосом. Следствием такого общегеномного эффекта хромосомных аберраций могут быть различные нарушения клеточной дифференцировки, нарушения пролиферативной активности клеток. Именно эти нарушения, как известно, особенно типичны для «клеточного синдрома» хромосомных болезней [47].

Возможно, столь характерные для хромосомных аберраций нарушения как общая задержка развития, умственная отсталость, искаженная (зачастую слабая) пролиферативная активность клеток как раз и являются следствием повреждений структурно-функциональной организации всего генома.

Естественно, что повреждения, разворачивающиеся на клеточном уровне, особенно в течение эмбрионального периода, могут иметь самые негативные последствия для развивающегося зародыша. Уменьшение числа клеток, формирующих эмбриональные зачатки и зачатки органов, нарушения клеточной адгезии, перемещения клеток и клеточных листков, десинхронизация процессов эмбриональной индукции должны неминуемо приводить к ранней эмбриональной гибели, к тяжелым порокам развития, к выраженной патологии самого плода и его провизорных органов, прежде всего, плаценты. По всей вероятности, именно эти события являются причиной гибели подавляющего большинства анеуплоидных зародышей человека во время имплантации.

В этой связи нельзя не отметить, что в целом избыток хромосомного материала проявляется на более поздних стадиях эмбриогенеза, чем его дефицит. Зародыши с трисомией большинства хромосом (за исключением хромосом 1 и 19) встречаются в раннем постимпланта-

ционном периоде (см. главу 5) и составляют до 60% всех спонтанных абортусов ранних сроков. Моносомии хромосом (за исключением моносомии X) крайне редки даже в материале спонтанных абортов. В свете вышеизложенного, а также из опыта модельных исследований на мышах с хромосомными транслокациями [20], можно выделить, по крайней мере, три механизма, объясняющих столь раннюю гибель зародышей с моносомией. Это экспрессия рецессивных летальных генов, дефицит генопродуктов гемизиготных (то есть оставшихся без своих гомологов) генов (аллелей), нарушение межхромосомных взаимодействий.

Экспрессия рецессивных летальных генов непарного гомолога представляется вполне логичной, однако вызывает ряд серьезных возражений. Прежде всего, такой эффект должен быть особенно выраженным у гаплоидных зародышей, то есть у партеногенетически развивающихся зародышей с половинным (гаплоидным) числом хромосом. В действительности, такие зародыши в эксперименте на мышах способны к развитию, по крайней мере, до имплантации, а в условиях создания искусственных гаплоидно-диплоидных химер способны к завершению эмбриогенеза и к дифференцировке. Более того, моносомии некоторых аутосом у мышей (хромосомы 2, 5, 17), как оказалось, могут проявляться раньше и приводить к гибели на более ранних стадиях развития, чем отсутствие целого гаплоидного генома [249]. Таким образом, гаплоидия и моносомия (по крайней мере, многих хромосом) не являются истинными клеточными летальными, однако, по каким-то причинам они не могут реализовать свою наследственную программу формирования целого организма [595].

Отсутствие любой хромосомы, несомненно, должно приводить к значительному снижению дозы продуктов тех генов, которые находятся на данной хромосоме (эффект дозы генов). До сих пор, однако, неясно, может ли 50%-ное снижение активности фермента повлиять на развитие клеток и целого организма. Такое заключение кажется оправданным для взрослого организма [187]. Однако дефицит дозы гена может иметь катастрофические последствия для ранних зародышей, в том числе для зародышей человека, когда речь идет о дозе регуляторных генов, генов-факторов транскрипции, генов клеточной адгезии и мембранных рецепторов [388]. Как показывают экспериментальные данные [56], такой механизм вряд ли является

главной или, по крайней мере, единственной причиной ранней гибели при моносомии аутосом.

Наконец, для объяснения данного феномена может быть привлечена *гипотеза структурно-функционального взаимодействия гомологичных хромосом на начальных стадиях эмбриогенеза* [14, 18, 20, 21, 249, 250]. Согласно этой гипотезе, сформулированной раньше и независимо от гипотезы геномного импринтинга [286, 612, 822], на начальных этапах развития оплодотворенной яйцеклетки у мышей, а возможно, и у других млекопитающих и у человека, существуют механизмы, с помощью которых гомологичные хромосомы «узнают» друг друга, результатом чего и является активация их генов. Отсутствие одной из хромосом приводит к «неопознанию» партнера и, соответственно, нарушению активации (репрессии генов) сохранившегося гомолога. Это означает, что эффект большинства аутосомных моносомий в действительности может быть сравним с эффектом нуллисомии (полным отсутствием) генов данной хромосомы, чем, собственно, и объясняется ранняя гибель зародышей с такой патологией кариотипа. Находки на тотальных препаратах дробящихся зигот мышей единичных случаев парного расположения отцовских и материнских хромосом, контактирующих между собой по всей длине, как будто свидетельствуют в пользу высказанной гипотезы [190]. В какой мере конъюгация родительских гомологов в процессе 1-го деления дробления обязательна, каково в действительности, ее функциональное значение пока неизвестно и требует дальнейшего изучения. Гипотеза взаимодействия (взаимной активации) гомологичных хромосом в развитии вполне доступна экспериментальной проверке. Для этого следует сравнить развитие зародышей с моносомией и с нуллисомией той же хромосомы. Имеющиеся данные согласуются с этим предположением [350]. Отметим также, что высказанная гипотеза отнюдь не противоречит теории геномного импринтинга, а скорее ее дополняет. Так, если допустить, что на некоторых хромосомах импринтированными являются именно гены «раннего» развития, а их активные аллели локализованы в отсутствующей хромосоме, то логичным итогом этой ситуации должна быть функциональная нуллисомия по данным генам. Следовательно, в обоих случаях именно функциональная нуллисомия может оказаться главной причиной столь ранней гибели зародышей при дефиците хромосом или хромосомных делециях.

Все рассмотренные предположения и гипотезы не объясняют массовой гибели зародышей с аномалиями кариотипа. Особенно интригующими представляются время реализации aberrантного кариотипа (от оплодотворения до постнатального периода), а также тяжесть и частота пороков развития. Наиболее логично на данном этапе предполагать, что данный феномен зависит, по крайней мере, от двух причин — скрытых (рецессивных) мутаций и вариаций структуры клеточного ядра.

Согласно первому предположению, ранее рассмотренные причины патологического эффекта хромосомных аномалий в каждом отдельном случае проецируются на индивидуальные особенности генома зародыша. Это означает, что наличие в геномах плода и, соответственно, у его родителей скрытых мутаций, неблагоприятных вариантов полиморфизма генов «предрасположенности» к факторам внешней среды, к акушерской патологии, к патологии эмбрионального развития могут резко усиливать фенотипический эффект хромосомных aberrаций. И наоборот, отсутствие таких мутаций и полиморфизмов, более того, присутствие таких генных вариантов, которые способствуют нормальной имплантации и росту зародыша, будет в значительной мере ослаблять и в какой-то степени нивелировать патологический эффект хромосомных aberrаций. Таким образом, именно индивидуальными особенностями генома зародыша с aberrантным кариотипом можно объяснить фенотипический плеiotропизм проявления хромосомного дисбаланса.

Следует также обратить внимание на то, что у зародышей с численными нарушениями кариотипа в силу индивидуальных особенностей формирование пространственной архитектоники ядра в связи с наличием или отсутствием целой хромосомы может существенно варьировать. Причем в каждом случае варианты в расположении хромосомных территорий и функциональных компартментов могут носить уникальный характер и по-разному нарушать работу целого генома. Отсюда и фенотипические эффекты при одной и той же хромосомной aberrации могут оказаться различными.

Какое из этих предположений ближе к реальности остается неизвестным и требует дальнейшей проверки.

В отличие от численных и структурных хромосомных аномалий, нарушения развития при ОРД не связаны непосредственно с генным дисбалансом хромосом или их фрагментов. Они обусловлены эпиге-

нетическими изменениями, вызванными хромосомным (геномным) импринтингом (см. раздел 11.2, и главу 7). Наличие импринтированных генов только одного из родителей и отсутствие комплементарных им функционально активных аллелей другого ведет к дисбалансу соответствующих генопродуктов. Следовательно, в случае ОРД реально наблюдается функциональная нуллисомия, то есть отсутствие генопродуктов одних аллелей (импринтированных) и избыток других (неимпринтированных). При этом дополнительные осложнения функции генома могут возникать в связи с проявлением клеточных леталей и рецессивных мутаций. Их вероятность особенно велика при *изодисомии* — ОРД в результате нерасхождения хромосом во 2-м мейотическом делении или удвоения хромосомы в первых делениях дробления моносомной зиготы, следствием которой является гомозиготность по всем генам одного гомолога (см. главу 7). Теоретически более благоприятна для развития *гетеродисомия* — ОРД после нерасхождения хромосом в 1-м мейотическом делении, когда в геноме зародыша оказываются оба гомолога (хромосомы) одного из родителей (обычно матери) [121]. Вопрос о влиянии ОРД на эмбриональное развитие изучен недостаточно. Имеются ориентировочные данные, что ОРД у плода обычно коррелирует с задержкой развития [532]. При этом, однако, нередко регистрируется наличие мозаицизма хромосом или даже полная форма трисомии аутосом в клетках плаценты. Оценить в какой мере задержка развития обусловлена проявлением ОРД в клетках самого плода, а в какой она связана с трисомией аутосом в клетках плаценты пока не представляется возможным.

Касаясь проблемы геномного (хромосомного) импринтинга, нельзя обойти вниманием и проблему фенотипики хромосомных аномалий в зависимости от природы aberrантной хромосомы, то есть от того, передается она потомству матерью или отцом. Данные экспериментов по цитогенетике эмбриогенеза лабораторных мышей с Робертсоновскими транслокациями убедительно свидетельствуют в пользу такого диморфизма. Так, установлено, что моносомия, по крайней мере, некоторых аутосом (хромосомы 2, 5, 17) у мышей проявляется значительно раньше и ведет к более тяжелым нарушениям морфогенеза, если единственная хромосома унаследована от самца. При наличии у моносомиков единственного гомолога материнского происхождения развитие идет заметно лучше, их гибель происходит на более позд-

них стадиях [14, 20]. Эти результаты доказывают функциональную неравнозначность гомологичных хромосом, которая может быть выявлена антенатально при численных хромосомных аномалиях. Имеет ли место подобный диморфизм хромосомных aberrаций у человека окончательно неизвестно. Логично допустить, что массовая гибель зародышей с хромосомными аномалиями, совместимыми с постнатальным развитием (моносомия X и трисомии 21, 13 и 18), отчасти обусловлена именно родительским происхождением хромосомы. Данные медицинской генетики, в том числе и анализ результатов пренатальной диагностики, в этом вопросе неоднозначны. Эффект геномного импринтинга родительских хромосом 21 не показан для пациентов с синдромом Дауна [670], а в случае X-хромосомы проявляется только в постнатальном периоде [413]. Этот интересный феномен заслуживает самого пристального внимания специалистов по цитогенетике развития человека.

11.6. Некоторые перспективы диагностики, профилактики и лечения хромосомных болезней

11.6.1. Диагностика

Ближайшие и отдаленные перспективы пренатальной диагностики хромосомных болезней достаточно подробно рассмотрены в главе 9. Здесь мы отметим только, что столь широко разрекламированная в средствах массовой информации доимплантационная диагностика, которая уже проводится в некоторых центрах вспомогательных репродуктивных технологий и в нашей стране, несмотря на очевидные успехи, никогда не станет массовой. Между тем, именно массовая пренатальная диагностика с охватом всех беременных может привести к реальным успехам в снижении частоты рождения детей с наследственными болезнями и врожденными пороками. При этом уместно еще раз подчеркнуть, что УЗ-обследование и, тем более, биохимический скрининг маркерных сывороточных белков в крови беременной женщины, даже проведенные в I триместре беременности, в лучшем случае позволяют только сформировать группы высокого риска хромосомной патологии у плода. Отсюда нетрудно предвидеть неуклонный дальнейший рост спроса на инвазивную пренатальную диагностику

с целью кариотипирования плода. Учитывая, однако, трудоемкость и длительность кариотипирования, особенно перспективной уже сегодня представляется молекулярная диагностика хромосомных болезней у плода, с помощью которой с достаточно большой точностью (около 96 %) и высокой производительностью (до 300 образцов плодного материала одновременно) можно вести диагностику нескольких наиболее частых хромосомных болезней. Важно, однако, еще раз обратить внимание читателя на то, что молекулярная диагностика не подменяет, а скорее дополняет стандартное цитогенетическое кариотипирование. Последнее всегда остается методом выбора, когда речь идет об особенностях всего кариотипа зародыша, в том числе и о необходимости идентификации структурных перестроек, требующих применения различных методов дифференциальной окраски FISH.

Различные методы дифференциальной окраски, используемые в цитогенетике, в том числе и с целью пренатальной диагностики, суммированы в Приложении. В последние годы существующий арсенал пополнился новыми методами цитогенетического анализа, удобными, а иногда просто незаменимыми при необходимости диагностики микрочромосомных перестроек или идентификации маркерных хромосом. К таким методам относятся *методы общего анализа кариотипа* (24-цветная FISH, R_x FISH, метод сравнительной геномной гибридизации (CGH)), *методы селективного хромосомного анализа* с помощью коммерческих ДНК-проб для диагностики различных микроделеционных синдромов и, наконец, *методы общего анализа индивидуальных хромосом* — многоцветное окрашивание индивидуальных хромосом с использованием микродиссекционных район-специфических ДНК-библиотек, а также создание таких библиотек путем микродиссекции метафазных хромосом с последующим приготовлением меченых ДНК-проб. Подробно с этими методами, с их возможностями и ограничениями можно ознакомиться в серии работ Н. Б. Рубцова и его сотрудников из НИИ цитологии и генетики СО РАН [165, 167].

11.6.2. Профилактика

Наиболее действенным методом профилактики хромосомных болезней на сегодняшний день является правильно организованная массовая пренатальная диагностика, позволяющая в значительной мере предотвратить рождение детей с наследственными болезнями. Немаловажное



Рис. 11.1. Генетическая карта репродуктивного здоровья.

значение имеет и медико-генетическое консультирование, дополненное мерами преемконцепционной профилактики врожденных пороков, акушерских осложнений и хромосомных болезней (см. главу 9).

Несомненно полезной для этих целей является и разработанная в нашем центре генетическая карта репродуктивного здоровья (рис. 11.1). Она позволяет еще до зачатия (или на ранних сроках беременности) установить кариотип обоих супругов, провести их тестирование на предмет гетерозиготного носительства мутаций наиболее частых генных болезней, а также определить полиморфизм генов, неблагоприятные аллельные варианты которых влияют на возникновение и проявление различной патологии у плода и у матери. В плане профилактики хромосомных болезней особенно важным представляется тестирование генов, контролирующих расхождение хромосом в мейозе [7, 8, 26].

При разработке мер профилактики хромосомных болезней с учетом экологических факторов важно также помнить о необходимости эффективной защиты половых клеток человека от действия различных мутагенов [31]. Прежде всего, заслуживает внимания охрана здоровья самой женщины. Напомним, что закладка первичных половых клеток и основные этапы мейоза, связанные с процессами конъюгации и рекомбинации хромосом в яйцеклетках, проходят внутриутробно, т. е.

еще в организме бабушки. Завершающие этапы созревания яйцеклетки, а также 1-е деление созревания ооцита происходят за несколько дней до предполагаемой овуляции в организме самой матери. Состояние яйцеклетки и, в первую очередь, активность и функциональная полноценность ее генома во многом определяет состояние плода и особенности его внутриутробного развития. Таким образом, вполне справедливо утверждение о том, что *каждая яйцеклетка физически и генетически связывает три поколения: бабушка → мать → ребенок* [444]. Данное обстоятельство необходимо иметь в виду при разработке рациональных мер профилактики наследственной и врожденной патологии у человека, учитывая при этом, что репродуктивная функция женщины является самым чувствительным критерием оценки повреждающего действия неблагоприятных экологических факторов.

11.6.3. Лечение

По вполне понятным причинам никаких эффективных способов лечения хромосомных болезней пока не изобретено. Действительно, глубокие нарушения метаболизма и жизнедеятельности каждой клетки не позволяют представить, даже теоретически, сколько-нибудь рациональные подходы к терапии хромосомных болезней. Ситуация осложняется еще и тем, что патологический геном, формирующийся при оплодотворении и на первых делениях дробления, так искажает программу индивидуального развития, что ее коррекция даже у плода и, тем более, после рождения вряд ли может привести к положительным результатам. Естественно, что при этом мы не имеем в виду различные палиативные средства, включающие симптоматическое лечение, а также методы, направленные на социальную адаптацию таких больных.

Большой скептицизм в этой связи вызывает мнение некоторых отечественных ученых о перспективности терапии хромосомных болезней путем трансплантации стволовых клеток. Отдельные (официально неподтвержденные) попытки «лечения» детей с болезнью Дауна путем трансплантации эмбриональных клеток, предпринимавшиеся в некоторых отечественных центрах, насколько нам известно, не дали положительных результатов. Конечно, создание таких искусственных химер, несущих наряду с анеуплоидными клетками и клетки с нормальным диплоидным кариотипом теоретически может способствовать ослаблению симптомов, обусловленных патологическим генотипом. Однако

трансплантированные клетки никогда не заменят уже существующие «больные» клетки и, тем более, вряд ли позволят когда-то добиться коррекции психических функций и умственных способностей больных с хромосомными аномалиями.

Вероятно, ситуация не выглядела бы так безнадежно, если бы каким-то способом на ранних стадиях развития удалось бы провести направленное выключение лишней хромосомы. К сожалению, пока нет никаких данных о существовании на хромосоме 21 центра инактивации всей хромосомы, подобного центру Хic на X-хромосоме. Таким образом, на сегодняшний день не существует реальных подходов к лечению хромосомных болезней и, прежде всего, наиболее частой из них — болезни Дауна. Прогресс в этой области может быть достигнут только за счет совершенствования методов симптоматической лекарственной терапии, а также путем дальнейшего улучшения методов социальной адаптации таких больных.

11.7. Новые направления цитогенетики эмбрионального развития человека

Методы и подходы цитогенетики развития находят все более широкое применение и в некоторых других, отличных от пренатальной диагностики, направлениях современной науки и медицины.

Прежде всего, они оказались незаменимыми в такой бурно развивающейся области как вспомогательные репродуктивные технологии. Оценка качества гамет и результатов оплодотворения *in vitro*, анализ состояния дробящихся зародышей перед трансплантацией, их доимплантационная диагностика требуют не только специальной подготовки для работы с ранними зародышами человека, но и хорошего владения всем арсеналом современных цитогенетических методов исследования.

Цитогенетика эмбрионального развития необходима и для изучения столь модных в наше время стволовых клеток. Что представляет собой их геном? Каков паттерн метилирования хромосом в эмбриональных и соматических стволовых клетках? Какие особенности состояния гетерохроматина и экспрессии генов у этих клеток-предшественников? Эти и многие другие вопросы, связанные с оценкой качества и изучением фундаментальных проблем генетики развития стволовых клеток требуют широкого использования методов и подходов цитогенетики эмбрионального развития человека, рассмотренных в данной монографии.

Наконец, недавно разработанная техника создания («конструирования») искусственных минихромосом, обладающих автономной репликацией и неограниченными пакующими возможностями в отношении кассет генно-инженерных конструкций, несущих функционально активные гены, открывает широкие перспективы для генной терапии наследственных болезней [472].

Заключение

Проблема феногенетики хромосомных aberrаций пока далека от своего решения. Не вызывает, однако, сомнения, что события, связанные с фенотипическим проявлением хромосомных aberrаций (пороки, остановка развития и гибель анеуплоидных зародышей), являются, в конечном счете, следствием нарушений функций генома. Они реализуются на молекулярном, хромосомном, клеточном, тканевом уровнях и на уровне целого организма. При этом избыток генетического материала, в целом, менее драматичен для внутриутробного развития, чем его дефицит. Отсюда логично предполагать, что решающее значение для феногенетики хромосомных aberrаций имеет генный состав aberrантной хромосомы или ее фрагментов. Дисбаланс соответствующих генов, по всей вероятности, и определяет специфические нарушения морфогенеза, характерные для многих хромосомных aberrаций. Нарушения баланса регуляторных факторов, в том числе генов-факторов транскрипции, последовательностей, кодирующих специфические малые ядерные РНК, а также нарушения архитектоники клеточного ядра, скорее всего, ответственны за проявление неспецифических нарушений при наличии хромосомных aberrаций на уровне клеток (клеточный синдром) и целого организма (задержка развития, пороки, спонтанные аборт). Патологический эффект ОРД обусловлен функциональными нарушениями, связанными с дефицитом или избытком продуктов импринтированных генов, с проявлением летальных мутаций и неблагоприятных генных полиморфизмов, которые могут существенно модифицировать фенотипические проявления как ОРД, так и хромосомных аномалий. Важнейшими факторами регуляции программы индивидуального развития на уровне хромосом являются процессы метилирования и гетерохроматизации. Анализ паттернов метилирования индивидуальных хромосом в клетках разных тканей и на разных стадиях развития может дать ценную информацию о структурно-функ-

циональных механизмах работы генома в эмбриогенезе человека. Высказанные предположения (активная роль ретротранспозонов в раннем эмбриогенезе, гипотеза взаимодействия (взаимной активации) гомологичных хромосом в развитии и др.) основаны, главным образом, на результатах экспериментальных исследований. Их проверка и уточнение с помощью различных методов непосредственно на зародышах человека является первостепенной задачей цитогенетики эмбрионального развития человека.

Основные перспективы практического применения методов и подходов цитогенетики развития касаются дальнейшего совершенствования методов хромосомного анализа, повышения качества профилактики хромосомной патологии с помощью медико-генетического консультирования, преемственной профилактики, массовой пренатальной диагностики, внедрения в практику генетической карты репродуктивного здоровья. Реальных методов или подходов к терапии хромосомных болезней не существует. Прогресса в этой области можно ожидать только за счет совершенствования симптоматической терапии с помощью новых лекарств направленного действия и путем улучшения методов социальной адаптации таких больных. Нет сомнения, что методы, подходы и опыт научных исследований в цитогенетике эмбрионального развития человека найдет широкое применение в решении практических задач центров вспомогательных репродуктивных технологий, в исследованиях стволовых клеток, в разработке научных и практических основ клеточной и генной терапии.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ

1.1. Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов периферической крови

Наиболее простым и доступным, и поэтому распространенным в клинической цитогенетике является анализ хромосом из лимфоцитов периферической крови. Циркулирующие в кровяном русле клетки в норме не пролиферируют, однако в культуральных условиях митогены (фитогемагглютинин (ФГА), покивид, конканавалин А и др.) стимулируют митотическое деление лимфоцитов. При микрометоде используют цельную капиллярную (из пальца или пятки) кровь, при полумикрометоде и макрометоде — венозную кровь или ее лейкоцитарную фракцию. В любом случае, при взятии крови необходимо строгое соблюдение стерильных условий.

Реактивы

Гепарин (25 000 ед.); культуральная среда (RPMI 1640 или Игла); антибиотики (пенициллин — 100 ед/мл + канамицин — 100 мкг/мл, или гентамицин — 50 мкг/мл); L-глутамин (конечная концентрация 0,2 мг/мл); сыворотка (эмбрионов коров); фитогемагглютинин, колхицин (колцемид).

Протокол 1.1

1. В стерильный шприц, содержащий 100–500 ед. гепарина, взять из периферической вены 1–3 мл крови, перемешать.

2. В пенициллиновые флаконы добавить: 4,25–4,5 мл среды с антибиотиками и глутамином; 0,75–0,5 мл сыворотки; 0,3–0,5 мл гепаринизированной крови; ФГА в концентрациях, рекомендуемых фирмой-производителем. Стандартное время культивирования — 72 часа при +37 °С в закрытой системе. Культуру ежедневно перемешивать, осторожно встряхивая флаконы.

3. На 71-м часу культивирования, т. е. за 50–60 мин до начала

фиксации, в культуру ввести колхицин (колцемид) в конечной концентрации 0,15–8,0 мкг/мл.

4. Содержимое флаконов перенести в центрифужные пробирки, клетки осадить центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин, супернатант удалить пипеткой, оставляя 0,3–0,5 мл над осадком. Осадок разбить энергичным встряхиванием и добавить 8–10 мл гипотонического раствора (0,55%-й раствор KCl или смесь 1%-го трехзамещенного цитрата Na и 0,55 % KCl, 1:1), перемешать пипетированием и инкубировать 15–20 мин при 37 °С.

5. Фиксация.

Вариант 1. Центрифугировать (10 мин, 1000 об/мин). Осадок тщательно разбить встряхиванием в 0,5 мл надосадочной жидкости. К осадку струйно прилить 8–10 мл холодного свежеприготовленного фиксатора (метанол + ледяная уксусная кислота, 3:1) и перемешать пипетированием. Первую фиксацию проводить при +4 °С в течение 30 мин. Затем фиксатор сменить 3–5 раз, добавляя порции по 5–7 мл.

Вариант 2. С префиксацией: по окончании времени гипотонической обработки в каждую пробу добавить по 0,5–1,0 мл холодного свежеприготовленного фиксатора (метанол + ледяная уксусная кислота, 3:1), перемешать пипетированием и осадить центрифугированием (10 мин, 1000 об/мин). Супернатант удалить, осадок разбить встряхиванием и провести фиксацию как описано выше в варианте 1.

Вариант 3. К осадку каплями добавить 1 мл фиксатора (метанол + ледяная уксусная кислота, 9:1), энергично встряхивая пробирку. Затем струйно прилить еще 9 мл фиксатора. Через 2–3 мин клетки осадить центрифугированием, к осадку прилить 10 мл ледяной уксусной кислоты. Пробирку вручную осторожно встряхивать в течение 10 мин, затем клетки осадить центрифугированием. К осадку прилить 8–10 мл фиксатора 3:1. Через 2–3 мин фиксатор заменить на свежую порцию и продолжить фиксацию в течение 50–60 мин.

6. Приготовление препаратов.

Раскапывание суспензии проводить на предметные стекла, охлажденные в морозильной камере или в холодной воде, нанося на препарат с высоты 30–50 см по 30–50 мкл суспензии. Стекла высушить при комнатной температуре. При плохом разбросе хромосом на препарате рекомендуется высушивать стекла над пламенем спиртовки или поджиганием фиксатора.

1.2. Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов пуповинной крови плода

Особенностью пренатальной диагностики с использованием крови плода, полученной путем кордоцентеза из пуповинной вены, является ограниченное количество (не более 1 мл) получаемого материала и необходимость исключения контаминации клетками крови материнского происхождения.

Протокол 1.2

1. В пробирку, содержащую 5,0 мл дистиллированной воды добавить 1,0 мл 0,25 N NaOH (смешивать непосредственно перед употреблением).

2. Добавить 0,05 мл крови (1–2 капли). Перемешивать покачиванием пробирки в течение 1 мин.

3. Переход цвета от розового до темного зелено-коричневого указывает на присутствие в образце крови матери. Ярко-розовый цвет свидетельствует об отсутствии контаминации.

1.3. Тест для оценки контаминации пуповинной крови плода кровью матери [234]

Протокол 1.3

1. Получение крови из пуповины плода осуществляют в операционной путем трансабдоминального кордоцентеза или производят забор крови из пуповинной вены при рождении.

2. Культивирование лимфоцитов крови плода проводится в полном соответствии со стандартным полумикрометодом (см. *п. 2–6 Протокола 1.1*).

1.4. Приготовление препаратов хромосом из ворсин хориона или плаценты

В пренатальной диагностике наиболее широко используют хромосомный анализ клеток хориона и плаценты, получаемых под контролем ультразвука. Для массовых цитогенетических исследований особенно удобными являются «прямые» методы. Они экономичны, позволяют через несколько часов после проведения процедуры получить результат.

Предлагаемые варианты позволяют успешно (в 98,6 % случаев) проводить цитогенетическую пренатальную диагностику у беременных на сроках 9–24 недель беременности и адаптированы к условиям отечественных цитогенетических лабораторий.

Получение материала

1. Непосредственно в операционной биоптат из шприца перенести в чашку Петри (диаметром 100 мм) со средой Игла или Хенкса, (+30–37 °С). Среда должна содержать гепарин (25 000 ед.) и антибиотика пенициллин (50000 ед.) и стрептомицин (25 мг) — на 500 мл среды.

2. Отбор ворсин проводить под контролем бинокулярной лупы МБС-2 в проходящем свете затемненного поля. Отобранные ворсины и их фрагменты перенести в свежую порцию среды в чашку Петри (диаметром 40 мм) и визуально оценить количество полученного материала. Следующие этапы приготовления препаратов могут несколько отличаться.

1.4.1. «Прямой» метод

Протокол 1.4 (ускоренный «прямой» метод)

1. Отмытый от крови материал (по 5–10 мг) незамедлительно перенести в пенициллиновые флаконы с 5 мл 0,9%-го трехзамещенного безводного цитрата натрия и колхицином в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Гипотоническую обработку проводить при комнатной температуре 40–50 мин или при +37 °С 35–40 мин.

2. 2-3 мл гипотонического раствора удалить пипеткой. Во флакон порциями добавить примерно такой же объем холодного свежеприготовленного фиксатора (метанол + ледяная уксусная кислота, 3:1). Первую порцию фиксатора добавить по каплям, встряхивая флакон, затем струйно. Префиксацию проводить при комнатной температуре 45–90 мин. На этом этапе можно транспортировать полученный материал в лабораторию.

3. Весь префиксирующий раствор удалить пипеткой, остатки жидкости удалить фильтровальной бумагой. Во флакон с ворсинками налить 4–5 мл холодного (+4 °С) фиксатора. Фиксацию проводить 1–2 часа при 0–10 °С.

4. В чистый пенициллиновый флакон налить 3–4 мл свежего фиксатора, поместить в него ворсинку (2–3 мг) и добавить равный объем дистиллированной воды.

5. Через 2–5 мин, когда ворсина опустится на дно, вынуть ее пинцетом, обсушить фильтровальной бумагой и перенести на чистое обезжиренное предметное стекло, подогретое над пламенем спиртовки примерно до +45–50 °С, в каплю (0,3–0,5 мл) 60%-й уксусной кислоты. Мацерацию проводить под контролем бинокулярной лупы МБС-2, наблюдая за выходом клеток в проходящем свете затемненного поля и передвигая ворсину по стеклу препаровальной иглой.

6. Через 2–3 мин ворсину перенести на следующее предметное стекло в каплю уксусной кислоты, а полученную на первом стекле суспензию клеток покачиванием стекла распределить по поверхности. Избыток суспензии перенести на следующий препарат.

7. На препарат нанести 2–3 капли фиксатора и высушить над пламенем спиртовки или поджиганием фиксатора. Аналогично готовят следующие препараты.

Примечания

1) Митотический индекс не зависит от морфологии ворсины, поэтому не следует пренебрегать ворсинами, не имеющими выраженной васкуляризации.

2) Качество метафазных хромосом существенно зависит от гипотонической обработки, поэтому необходимо заблаговременно апробировать каждую новую партию цитрата натрия.

3) Гипотонический раствор, как и 60%-й раствор уксусной кислоты следует готовить в день использования.

4) Препараты следует готовить непосредственно в день забора материала, при увеличении срока хранения фиксированного материала значительно ухудшается их качество.

5) Из образца весом до 5 мг делать не более двух препаратов.

Протокол 1.5 (метод «стряхивания — отпечатывания» [184])

Пп. 1–5 см. Протокол 1.4.

6. Несколько раз приподнять мацерированную ворсинку в капле размягчающей смеси, т. е. провести «стряхивание» клеток и сделать этой ворсинкой серию отпечатков на стекле. Перенести ворсинку на следую-

щее предметное стекло в каплю уксусной кислоты и повторить манипуляции.

7. См. п. 7 *Протокола 1.4.*

1.4.2. Кратковременное культивирование («полупрямой» метод)

Протокол 1.6

1. Биоптаты поместить в пенициллиновые флаконы с 5 мл культуральной среды и инкубировать 1–2 или 24 часа в термостате с 5 % CO₂ или в замкнутой системе при +37 °С. В случае 24-часовой инкубации в среду добавить 0,5–1 мл эмбриональной телячьей сыворотки.

2. За 30–50 мин до фиксации ввести колхицин в конечной концентрации 0,5–1 мкг/мл.

3. Заменить культуральную среду на 5 мл 0,9%-го цитрата натрия и проводить гипотоническую обработку в течение 15 — 20 мин.

4. Остальные этапы соответствуют *пп. 2–6 Протокола 1.4.*

Примечания

1) Удастся повысить митотический индекс, поместив ворсины хориона в культуральной среде на 6–12 часов в холодильник (+4 °С), а затем перенести в термостат (+37 °С).

2) Нецелесообразно инкубировать мелкие фрагменты ворсинок. Образец для культивирования должен быть не менее 8–10 мг.

3) Инкубирование не улучшает качество метафазных хромосом для традиционных методов дифференциальной окраски. Целесообразно использовать этот метод для получения репликационного рисунка дифференциальной окраски.

1.5. Подготовка препаратов хромосом из различных эмбриональных органов

Анализ хромосомного набора в клетках различных тканей и органов зародыша человека необходим как для верификации диагноза, установленного при исследовании клеток хориона, так и для сопоставления хромосомного набора собственно эмбриона и его провизорных органов. Обычно для подобных исследований используют культуры эмбриональных фибробластов. Предлагаемые нами методы основаны

на изучении спонтанных митозов в различных тканях плода, полученных из абортного материала, и позволяют получить результат в течение 1–2 дней [16].

Получение материала

Непосредственно в операционной произвести отбор материала — целого эмбриона или его фрагментов, отмыть от крови гепаринизированной средой Игла (Хенкса) или физиологическим раствором и доставить в лабораторию. Если операционный блок расположен в непосредственной близости, возможна доставка всего полученного материала в кювете и отбор частей зародыша в лаборатории.

1.5.1. Приготовление препаратов из фрагментов тканей эмбрионов

Протокол 1.7

1. Тонкий кишечник и пищевод разрезать на кусочки длиной 2–3 мм, остальные органы (желудок, легкие, почки, костный и продолговатый мозг, мозговые пузыри, роговицу глаза) измельчить ножницами.

2. В пенициллиновый флакон с 5 мл гипотонического раствора, содержащего колхицин (колцемид) в конечной концентрации 1 мкг/мл, поместить примерно по 10 мг образца (2–3 кусочка) и инкубировать при комнатной температуре 45–50 мин или при +37 °С 30–45 мин. Затем провести префиксацию и фиксацию материала, после чего приготавливать препараты.

3. Препараты хромосом из различных органов зародыша человека готовить аналогично препаратам из ворсин хориона и плаценты по ускоренному «прямому» методу (*Протокол 1.4*).

1.5.2. Приготовление препаратов из суспензии клеток (печени, костного мозга)

Протокол 1.8

1. Фрагменты печени поместить в чашку Петри диаметром 40 мм, часовое стекло или гомогенизатор с плохо притертым пестиком, налить небольшое количество питательной среды, содержащей колхицин в концентрации 0,5 мкг/мл, и гомогенизировать. Фрагменты костного мозга сразу же перенести в пробирки с небольшим количеством среды с колхицином

и осторожным пипетированием добиться получения суспензии.

2. В полученную суспензию добавить среду с колхицином, пипетировать и перенести в центрифужные пробирки.

3. Инкубировать клетки 1,5–2 часа при +37 °С (общее время обработки клеток колхицином не должно превышать 2 час). Дальнейшие этапы приготовления препаратов аналогичны описанным для культуры лимфоцитов (см. *пп. 4–6 Протокола 1.1*).

Примечания

1) Для облегчения выхода клеток из фиксированного материала кусочка кишечника или пищевода разрезать вдоль при помощи препаровальной иглы в капле уксусной кислоты на препарате.

2) При приготовлении препаратов из печени и мозга следует соблюдать осторожность, так как фиксированные кусочки очень хрупкие и легко разрушаются. Качество препаратов из печени и костного мозга можно повысить, используя суспензию клеток.

2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА НЕОКРАШЕННЫХ И РАВНОМЕРНО ОКРАШЕННЫХ ХРОСОМ

2.1. Фазово-контрастная микроскопия

Первый этап анализа состоит в просмотре неокрашенных препаратов с помощью фазово-контрастного устройства. При этом производится оценка качества препаратов для дальнейшего анализа с помощью различных типов окрашивания.

2.2. Рутинная окраска хромосом

Сплошное, или равномерное, окрашивание хромосом получило название рутинной окраски. Этот метод позволяет провести подсчет хромосом на метафазной пластинке и их групповую идентификацию и не пригоден для целей кариотипирования. Ограниченные возможности метода сузили область его применения в современной цитогенетике до анализа и учета некоторых типов хромосомных aberrаций в исследованиях мутагенной активности факторов среды.

Протокол 2.1

1. Препараты окрасить 3–5%-м раствором красителя Гимза на стан-

дартном фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 5–15 мин в бюксе с красителем или нанесением на препарат 2–5 мл окрашивающего раствора.

2. Промыть проточной водой и высушить.

3. МЕТОДЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ОКРАСКИ ХРОМОСОМ

Наиболее полное представление о кариотипе можно получить на препаратах дифференциально окрашенных хромосом. Методы дифференциального окрашивания позволяют идентифицировать каждую хромосому набора по специфичному для гомологичной пары линейному рисунку в соответствии с основными типами окрасок: Q, G и R.

3.1. Методы G-окраски хромосом

3.1.1. Метод GTG

Протокол 3.1 [511]

Растворы

1. Буферный раствор SKN, pH 7,8 (для «прямых» препаратов) или GKN, pH 7,8 (для культивированных клеток).

2. 0,25%-й раствор трипсина. Трипсин растворить в буфере SKN, pH 7,8.

3. 5%-й раствор красителя Гимза: 1 мл маточного раствора красителя растворить в 20 мл буфера SKN, pH 7,0.

Техника окрашивания

1. Препараты (свежеприготовленные или хранившиеся при комнатной температуре не более 10 дней) выдерживать при 100 °С в течение 30 мин.

2. Охладить приблизительно до 30–40 °С.

3. Обработать 2–5 сек в растворе трипсина.

4. Ополаскивать (10–15 сек) в буфере SKN, pH 9,0.

5. Окрашивать 5–10 мин, нанося на препарат по 2–3 мл красителя.

6. Смыть краситель проточной водой и высушить.

Примечания

- 1) Необходимо пользоваться свежеприготовленным буферным раствором.
- 2) Каждый препарат следует окрашивать свежей порцией красителя.

Протокол 3.2**Растворы**

1. Раствор GKN, pH 7,0.
2. Раствор версена.
3. 0,25%-й раствор трипсина (на воде или физиологическом растворе).
4. 2%-й раствор красителя Гимза на 0,01 М Na-фосфатном буфере.

Техника окрашивания

1. Свежеприготовленные препараты оставить на ночь, хранившиеся при комнатной температуре 2–3 дня — на 1 час, при +60 °С.
2. Обработать при комнатной температуре в смеси растворов версена (30 мл), GKN (24 мл) и трипсина (6 мл). Время обработки подбирать эмпирически для каждой серии препаратов (30 сек — 3 мин).
3. На 15 сек поместить в GKN.
4. Окрашивать 3–7 мин красителем Гимза, нанося на каждый препарат свежую порцию красителя.

3.1.2. Методы G-окраски без применения трипсина**Протокол 3.3**

1. На свежеприготовленные препараты из клеточной суспензии нанести по 2–3 мл 2%-го раствора красителя Гимза, заблаговременно (за 6–8 часов) приготовленного на стандартном фосфатном буфере, pH 6,8.
2. Окрашивать в течение 5–7 мин.
3. Промыть проточной водой и высушить.

Протокол 3.4 [283]

1. На свежеприготовленные или хранившиеся при комнатной температуре не более 10 дней препараты нанести под покровные стекла 0,4–0,5 мл буферного раствора 2×SSC и облучать в течение 15–25 мин под ультрафиолетовой лампой. Источник УФС типа ОКН-11 должен

находиться на расстоянии 20–25 см, типа ОРК-21 — 45–50 см от поверхности препарата.

2. Покровные стекла смыть проточной или дистиллированной водой.

3. На влажные стекла нанести по 2–3 мл 3–4%-го раствора красителя Гимза на стандартном фосфатном буфере, pH 6,8, окрашивать 5–10 мин.

4. Промыть проточной водой и высушить.

Протокол 3.5 [819]

1. Препараты поместить в раствор 2xSSC и инкубировать в течение 1–2 часов при +60 °С.

2. Дегидратировать в серии спиртов (70°, 80°, 96°), высушить.

3. Окрашивать 3–5%-м раствором красителя Гимза на 0,06 М К-Na-фосфатном буфере, pH 6,8, 5–8 мин.

4. Промыть проточной дистиллированной водой, высушить.

3.2. Методы R-окраски хромосом (RHG, RFA)

Рисунок хромосом при R-окраске противоположен G-рисунку, что делает его незаменимым для анализа некоторых типов аберраций, особенно при идентификации ломкой X-хромосомы на дифференциально окрашенных препаратах. Несмотря на то, что метод очень капризен, ему отдают предпочтение как основному методу дифференциального окрашивания в некоторых зарубежных лабораториях.

Растворы

0,06 М фосфатный буфер Соренсена.

Протокол 3.6 [875]

1. Препараты инкубировать в предварительно нагретом буферном растворе. Температуру и время подбирать для каждой партии препаратов эмпирически, увеличивая жесткость обработки в зависимости от времени хранения препаратов (6–10 мин при 85 °С для препаратов 10–30-дневной давности и 60–120 мин при 87 °С для односуточных).

2. Промыть препараты в порции буфера при комнатной температуре и затем проточной дистиллированной водой.

3. Провести препараты через серию спиртов повышающейся кон-

центрации (70 °, 80 °, 96 °). Этот этап не является строго обязательным, его используют только в случае чрезмерного разбухания хромосом вследствие предобработки.

Протокол 3.7 (RHG-метод)

1. Окрашивать препараты красителем Гимза (4–5 % в буфере Соренсена, рН 6,7) 10–12 мин.
2. Смыть краситель проточной водой, высушить.
3. Анализировать препараты в проходящем свете с фазово-контрастным устройством.

Протокол 3.8 (RFA-метод)

1. Окрашивать препараты акридиновым оранжевым (0,01 % в буфере Соренсена, рН 6,5) 4–5 мин.
2. Промыть препараты тем же буферным раствором 1 мин, заключить под покровное стекло в каплю того же буферного раствора.
3. Анализировать на люминесцентном микроскопе при длине волны 450–500 нм.

Примечания

- 1) Свежеприготовленные препараты нуждаются в более длительной обработке. Однако следует иметь в виду, что при увеличении продолжительности обработки тип окрашивания может видоизменяться в направлении R-, RT-, TC-, C-рисунков.
- 2) RHG-метод требует подбора условий для каждой новой партии препаратов и красителя Гимза.
- 3) RFA-метод позволяет получить более стабильный рисунок.

3.3. Методы Q-окраски хромосом (QFQ, QFH)

3.3.1. Метод QFQ

Для получения Q-окраски хромосом используют акрихин и его производные (атебрин, акрихин-иприт, акрихин-пропил). Существует несколько вариантов метода, незначительно отличающихся по результатам. В отечественных лабораториях этот метод не нашел широкого применения для анализа метафазных хромосом, однако его используют при анализе Y-хроматина в ядрах буккального эпителия.

Растворы

Стандартный фосфатный буфер (рН 6,7) или цитратно-фосфатный буфер Мак-Ильвейна (рН 5,4).

Протокол 3.9 [64]

1. Краситель развести в одном из буферных растворов. Рекомендуемые концентрации: 5 мкг/мл, 50 мкг/мл или 1–5 мг/мл.
2. Окрашивать препарат под покровными стеклами или в бюксе 10–20 мин.
3. Промыть в нескольких сменах буферного раствора или проточной водой.
4. Заключить препарат в буфер или воду.
5. Анализировать на люминесцентном микроскопе при длине волны 450–500 нм.

Примечания

- 1) При использовании низких концентраций красителя можно анализировать препарат непосредственно в растворе красителя без промывания.
- 2) Заключающий раствор можно приготовить из смеси буфера с глицерином в соотношении 1:1.

3.3.2. Метод QFH

Рисунок флуоресценции при окрашивании хромосом флуорохромом Hoechst 33258 с последующим контрастированием актиномицином D принципиально не отличается от Q-рисунок, получаемого с помощью акрихина за исключением интенсивно светящихся гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16, темных при традиционном QFQ-рисунок. Преимущества QFH-рисунок заключаются и в том, что Hoechst значительно превосходит акрихин по яркости, а контрастирование окраски антибиотиком актиномицином D дает очень четкую и стабильную картину дифференциальной флуоресценции. Хотя этот метод применяется для окраски хромосом человека только в нашей лаборатории, предлагаемый вариант достоин широкого применения в клинической цитогенетике и особенно в пренатальной диагностике.

Растворы

1. Насыщенный солевой буферный раствор, pH 7,2.

2. Раствор флуорохрома Hoechst 33258.

Маточный раствор красителя на дистиллированной воде в концентрации 1 мг/мл (может быть использован в течение года при хранении при +4 °С).

Рабочий раствор: приготавливать из маточного на насыщенном солевом буферном растворе, pH 7,2, в концентрации 0,5 мкг/мл. Использовать в течение 2–4 недель.

3. Актиномицин D (аналоги: актиномицин C, дактиномицин) растворить в концентрации 0,2–0,3 мг/мл в буфере состава: 1 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ ЭДТА.

4. Заключающий раствор: цитратно-фосфатный буферный раствор, pH 4,2, смешать с глицерином в соотношении 1:1 (по объему).

Протокол 3.10 [16]

1. Инкубировать препараты 10–20 мин в насыщенном солевом буферном растворе, pH 7,2 (время инкубирования свежеприготовленного препарата можно сократить до 3–5 мин).

2. Окрашивать 12–20 мин в растворе красителя Hoechst 33258.

3. Инкубировать в свежей порции буферного раствора 10–20 мин.

4. Высушить препарат и нанести 2 капли раствора актиномицина, накрыть каждую каплю чистым сухим покровным стеклом и поместить в защищенное от света место на 15–20 мин.

5. Смыть покровные стекла и промыть препарат проточной дистиллированной водой. Высушить.

6. Нанести на препарат под каждое покровное стекло по 1 капле заключающего раствора. Избыток жидкости аккуратно удалить фильтровальной бумагой.

7. Анализировать на люминесцентном микроскопе при длине волны 360–390 нм. При использовании микроскопов серии «Люам» возбуждающий светофильтр «УФС 6-3» или 6–5 в комплекте со светофильтром СЗС-24, запирающий ЖСЗ+БС8 (голубая пластинка опак-иллюминатора).

Примечания

1) Всю процедуру окрашивания проводить в бюксах из темного стекла или обернутых в черную бумагу.

2) Качество дифференциальной окраски зависит от pH растворов и времени хранения препаратов до и после окрашивания. Анализ хромосом лучше проводить на препаратах, хранившихся при +60 °С 1–12 часов или 2–7 дней при +37 °С до окрашивания и 2–5 дней при +4 °С после окраски, избегая таким образом «выцветания» дифференциальной окраски.

3) Окрашенные препараты оберегать от воздействия света.

4) Использовать нефлуоресцирующее иммерсионное масло, при его отсутствии — глицерин.

Глицерин не должен иметь собственной люминесценции.

3.4. Методы избирательной окраски гетерохроматиновых районов хромосом

В отличие от G- или R-дифференциальной окраски, которые позволяют получить исчерченность вдоль хромосомы и на основе этого рисунка идентифицировать каждую хромосому, методы избирательного окрашивания направлены на выявление отдельных районов хромосом, в частности, прицентромерного гетерохроматина сегментов (С-окрашивание) или активных ядрышкообразующих районов (ЯОР-или NOR-окрашивание).

3.4.1. Метод CBG

С помощью С-метода выявляются центромерные районы всех хромосом, а также полиморфные гетерохроматиновые блоки, локализованные в прицентромерных районах акроцентрических хромосом и в длинных плечах хромосом 1, 9, 16 и Y.

Протокол 3.11 [64]

1. Препараты, хранившиеся после приготовления 3–10 дней при +37 °С, инкубировать в 0,2 N HCl при комнатной температуре в течение 1 часа.

2. Промыть проточной дистиллированной водой или в трех сменах воды, слегка подсушить.

3. Инкубировать в насыщенном (5 %) растворе $\text{Ba}(\text{OH})_2$ при 60°C в течение 3–20 мин (время обработки обратно пропорционально сроку хранения препаратов и раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$). Желательно использовать свежеприготовленный раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

4. Промыть препарат в 0,1 N HCl, затем в трех сменах дистиллированной воды и слегка подсушить.

5. Инкубировать в $2\times\text{SSC}$ при $+60^\circ\text{C}$ в течение 1 часа (время инкубирования можно увеличивать до суток при комнатной температуре).

6. Окрашивать 10–15 мин в растворе красителя Гимза (40 мл 0,1 M фосфатного буфера, pH 6,8, 1,2 мл метанола и 2 мл красителя).

3.4.2. Метод G-11

При этом методе гетерохроматиновые блоки на хромосоме 9 окрашиваются в густой розово-пурпурный цвет в отличие от всех других районов хромосом. Метод особенно удобен при уточнении инверсий этого участка.

Протокол 3.12 [64]

1. Приготовить 2%-й раствор красителя Гимза на дистиллированной воде, pH 11,0, используя 0,1 M раствор NaOH.

2. Нанести на препарат свежеприготовленный раствор красителя и окрашивать в течение 5–10 мин.

3. Смыть краситель проточной водой, высушить.

Примечания

1) Для окрашивания пригодны препараты, хранившиеся 7–10 дней.

2) Для свежеприготовленных препаратов условия (время, вариации pH от 10,5 до 11,6) подбираются эмпирически.

3.4.3. Методы с использованием флуорохромов

Растворы

1. Цитратно-фосфатный буферный раствор, pH 7,0 и pH 4,0.

2. Раствор метилового зеленого.

Маточный раствор — 1,76 % на буфере, pH 4,0. Раствор можно сохранять при $+4^\circ\text{C}$ в течение нескольких месяцев.

Рабочий раствор (готовить непосредственно перед употреблением) —

маточный раствор развести в соотношении 1 : 50 буферным раствором с pH 7,0.

3. Рабочий раствор флуорохрома Hoechst 33258 (способ приготовления см. в методе QFH).

4. Заключающий раствор (см. там же).

Протокол 3.13 [16]

1. На препараты (свежеприготовленные или хранившиеся несколько дней) нанести по 2–4 мл рабочего раствора метилового зеленого и инкубировать 25–30 мин при комнатной температуре.

2. Промыть проточной дистиллированной водой, высушить.

3. Окрашивать флуорохромом Hoechst 33258 как при QFH-технике.

4. Под покровные стекла нанести по 1 капле заключающего раствора.

5. Анализировать как QFH-исчерченность.

Примечания

1) Метод позволяет выявлять гетерохроматиновые блоки преимущественно на 9, а также на 1, 13–15, 16, 19, 21, 22 и Y хромосомах.

2) При получении тусклой флуоресценции можно докрасить препарат флуорохромом Hoechst 33258 и наоборот.

3) При использовании препаратов, ранее окрашенных для анализа QFH-рисунка, увеличить время обработки метиловым зеленым и сократить до 5 мин повторное окрашивание флуорохромом Hoechst 33258.

4) Препараты, окрашенные ранее красителем Гимза для рутинного анализа, обесцветить в стандартном фиксаторе (этанол — ледяная уксусная кислота, 3:1).

4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Приведенные ниже методы не используются в ежедневной практике, однако для целого ряда исследований они незаменимы. Предложенные варианты достаточно просты и воспроизводимы.

4.1. Репликационные варианты G- и R-дифференциального окрашивания хромосом

Использование аналогов тимидина — 5-бромдезокситуридина (БДУ) или 5-флуорозидеокситуридина (ФДУ) позволяет получить дифференциальную окраску хромосом. Рисунок дифференциальной исчерченности основан на одновременной репликации ДНК G- и R-блоков в S-фазе клеточного цикла. Введение БДУ в культуру в начале S-периода позволяет получить рисунок, аналогичный G-исчерченности, в конце S-периода — R-рисунок.

Растворы (приготавливать на дистиллированной воде для инъекций)

1. БДУ — 1 мг/мл.
2. Тимидин — 1 мг/мл.
3. Бромистый этидий — 1 мг/мл.

4.1.1. Репликационный G-рисунок

Протокол 4.1. (для клеток хориона)

1. Поставить кратковременную 24-часовую культуру (см. *Протокол 1.6*).
2. В начале культивирования (если ворсины в среде находились в холодильнике — то перед тем, как перенести флаконы в термостат) ввести БДУ в конечной концентрации 25–30 мкг/мл.
3. Через 12 часов культивирования ворсинки отмыть в небольшой порции среды и поместить во флаконы с культуральной средой прежнего состава (без БДУ). Для получения более четкого рисунка добавить тимидин в конечной концентрации 20–25 мг/мл. Культивирование продолжать в течение следующих 12 часов.
4. За 1–2 часа до фиксации в культуру ввести колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Во избежание чрезмерной конденсации хромосом одновременно ввести бромистый этидий в конечной концентрации 5–10 мкг/мл.

Протокол 4.2 (для клеток амниотической жидкости и лимфоцитов)

1. Культивирование клеток проводить в соответствии с общепринятыми методами (см. раздел 1.1, 1.2 и 1.5).

2. За 16–20 часов до фиксации в культуру ввести БДУ в конечной концентрации 15–25 мкг/мл.

3. За 6–7 часов до фиксации культуру лимфоцитов перенести в стерильные центрифужные пробирки, дважды промыть культуральной средой (по 4–5 мл), осаждая клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 7–10 мин, ресуспендировать в свежей порции питательной среды и ввести тимидин в конечной концентрации 20–25 мкг/мл.

4. При культивировании амниоцитов среду, содержащую БДУ, удалить, промыть монослой 1–2 сменами теплой (+37 °С) среды, в свежую порцию питательной среды добавить тимидин. Концентрации БДУ и тимидина, а также временные интервалы такие же, как и для лимфоцитов.

4.1.2. Репликационный R-рисунок (RBG, RBA)

Протокол 4.3 (для клеток хориона)

Концентрации вводимых реагентов аналогичны описанным в *Протоколе 4.1*. Изменить последовательность операций: в начале культивирования ввести тимидин, заменяя его через 12 часов на БДУ. Инкубацию в течение первых 12 часов можно проводить и в отсутствие тимидина.

Протокол 4.4 (для клеток амниотической жидкости и лимфоцитов)

Культивирование клеток проводить в соответствии с общепринятыми методами (см. раздел 1.1, 1.2 и 1.5). За 6–7 часов до фиксации в культуру ввести БДУ в конечной концентрации 30 мкг/мл. Для получения более четкой картины исчерченности одновременно с колхицином рекомендуется ввести бромистый этидий в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Протокол 4.5 (RBG)

Растворы

1. Hoechst 33258 — 0,02 %.
2. 5%-й раствор красителя Гимза на 0,1 М фосфатном буфере, рН 6,8.

Техника окрашивания

1. На свежеприготовленные или хранившиеся не более двух недель при комнатной температуре в защищенном от света месте препараты

нанести по 3–5 мл раствора Hoechst.

2. Облучать в течение 80–90 мин ультрафиолетовой лампой, как для получения G-рисунка (см. *Протокол 3.4*).

3. Смыть покровные стекла проточной дистиллированной водой и окрашивать препарат красителем Гимза.

Протокол 4.6 (РВА)

Растворы

1. 0,1%-й раствор акридинового оранжевого. Раствор красителя пригоден в течение месяца при хранении при +4 °С.

2. 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,8–7,0.

Техника окрашивания

1. Нанести на препарат под покровные стекла по 1–2 капли акридинового оранжевого на 1–2 мин.

2. Смыть покровные стекла и промыть препарат проточной дистиллированной водой.

3. Препарат заключить в 0,1 М Na-фосфатный буфер.

4. Анализировать на люминесцентном микроскопе при длине волны 430–480 нм. При использовании микроскопа серии «Люам» светофильтр возбуждения ФС в комплексе с фильтром СЗС-24, запирающие светофильтры — ЖС-18 + ЖСС-19 (зеленая пластинка opak-иллюминатора).

Примечания

1) Окрашенный препарат должен флуоресцировать в желто-оранжевом спектре. При избыточном окрашивании (красная область спектра) необходимо промыть препарат 1–2 мин в буфере. Свечение в зеленой области означает, что препарат недокрашен. В этом случае смыть проточной водой покровные стекла, высушить и докрасить препарат акридиновым оранжевым. Небольшое смещение в красную область спектра можно преодолеть, наблюдая за изменением спектра люминесценции в процессе анализа.

Протокол 4.7

Растворы

1. Hoechst 33258 — 0,02 %.

2. 2×SSC, pH 7,0.

3. Растворы для окраски и заключения препаратов см. в разделе «Гибридизация in situ» (Окраска и заключение препаратов, пп. 1–3, 6).

Техника окрашивания

- 1–2. См. *Протокол 4.5*.
3. Смыть покровные стекла, поместить препараты в стакан с $2\times\text{SSC}$.
4. Инкубировать в течение 1 часа при 60°C в $2\times\text{SSC}$.
5. Промыть препараты дистиллированной водой и высушить.
6. Заключить препараты под покровные стекла в раствор красителей (см. *Протокол 5.14*).
7. Анализировать препараты на люминесцентном микроскопе (см. таблицу в разделе «Гибридизация in situ»).

Протокол 4.8 (иммуноцитохимическая детекция включения БДУ)

1. Препараты метафазных хромосом после инкубирования в присутствии БДУ, денатурировать в 2 М HCl в течение 10–20 минут при комнатной температуре, после чего провести через серию ледяных спиртов 70° , 80° и 96° .

2. Инкубировать препараты в двух сменах фосфатного буфера ($1\times\text{PBS}$, pH 7,2) по 10 минут в каждом при комнатной температуре.

3. Нанести на препараты по 150 мкл блокирующего раствора (Boehringer Mannheim) на $1\times\text{PBS}$, накрыть покровным стеклом и инкубировать 30 минут во влажной камере при температуре $+37^\circ\text{C}$.

4. На влажные препараты под покровные стекла нанести по 80–100 мкл блокирующего раствора (Boehringer Mannheim) на $1\times\text{PBS}$, содержащего антитела к БДУ (mouse AT-BudR 0,5 мкг/мл). Препараты инкубировать 80 минут во влажной камере при температуре $+37^\circ\text{C}$.

5. Отмыть препараты в трех сменах фосфатного буфера $1\times\text{PBS}$ (pH 7,2), содержащего 0,5 % Tween 20, по 5 минут в каждой, на водяной бане при температуре $+43^\circ\text{C}$.

6. На влажные препараты под покровные стекла нанести по 100 мкл блокирующего раствора (Boehringer Mannheim) на $1\times\text{PBS}$, содержащего антитела, конъюгированные с FITC (goat-anti-mouse-FITC), в концентрации, рекомендуемой фирмой-изготовителем (Sigma) (0,2 мкг/мл), и инкубировать 60 минут во влажной камере при $+37^\circ\text{C}$.

7. Препараты отмывать в трех сменах фосфатного буфера $1\times\text{PBS}$ (pH 7.2), содержащем 0,5 % Tween 20, по 5 минут в каждой, на водяной

бане при температуре +43°C, ополоснуть дистиллированной водой, дегидратировать в серии спиртов (70°, 80°, 96°) и высушить на воздухе.

8. Окраска и заключение препаратов (условия проведения процедуры и растворы см. *Протокол 5.14*).

4.2. Метод выявления ломкой X-хромосомы

В настоящее время цитогенетические исследования утратили свое значение как единственно возможного метода лабораторной диагностики синдрома Мартина–Белла. Тем не менее, цитогенетический анализ наряду с методами молекулярной генетики и иммуноцитохимии может быть частью комплексной диагностики. Предлагаемый нами вариант приготовления препаратов для регистрации ломкой X-хромосомы, основанный на использовании так называемого «тимидинового шока», вполне эффективен и доступен для большинства цитогенетических лабораторий.

Растворы

1. Культуральная смесь: 4,9 мл среды RPMI 1640 с глутамином, 0,1 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3–0,4 мл цельной гепаринизированной крови.

2. Раствор тимидина: на 4 культуральных флакона 6 мг тимидина развести в 200 мкл дистиллированной воды (из расчета 1,5 мг на пробу, конечная концентрация 0,3 мг/мл).

Протокол 4.9

1. Культивирование лимфоцитов проводить по стандартному полумикрометоду (см. выше). Рекомендуется ставить не менее 4 проб.

2. Общее время культивирования при 37°C составляет 96 часов (4 суток).

3. Через 72 часа от начала культивирования в каждую пробу ввести 50 мкл раствора тимидина.

4. Дальнейшие этапы (гипотоническую обработку, фиксацию и приготовление препаратов) проводить стандартным способом.

5. Окрашивать препараты рутинным или R-методом.

6. Анализировать по 25–30 метафазных пластинок из каждой пробы.

Примечание

Маркирование прицентромерного района X-хромосомы с использованием метода FISH существенно облегчает регистрацию ломкого сайта, так как ограничивает наблюдения анализом X-хромосом.

5. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ *IN SITU* (FISH)

Метод гибридизации *in situ* основан на способности хромосомной ДНК образовывать устойчивые гибридные молекулы с ДНК(РНК)-зондами непосредственно на препаратах фиксированных хромосом и интерфазных ядер. С помощью этого метода можно определить точное местоположение практически любой последовательности ДНК или РНК непосредственно в клетке, клеточном ядре или на хромосомах.

Использование метода FISH в цитогенетической диагностике позволяет идентифицировать структурные хромосомные перестройки, устанавливать природу маркерных хромосом, проводить анализ численных нарушений хромосомного набора как на метафазных хромосомах, так и в интерфазных ядрах. Комбинация различно модифицированных проб, выявляемых с помощью разных систем детекции, позволяет одновременно определять местоположение двух и более последовательностей ДНК в одном интерфазном ядре или на одной метафазной пластинке.

В настоящее время для удобства исследователей разработаны коммерческие наборы зондов и реактивов для FISH, которые используются при диагностике наиболее частых численных и структурных аберраций хромосом.

Согласно классической схеме проведения неизотопной гибридизации ДНК–ДНК *in situ* методики FISH включают приготовление ДНК-зондов, предгибридизационную обработку препаратов, проведение реакции гибридизации, постгибридизационные отмывки, детекцию гибридных молекул, окраску и заключение препаратов.

5.1. ДНК-зонды

Основные требования, предъявляемые к ДНК-зондам для FISH, следующие: высокая степень очистки, эффективность включения модифицированных нуклеотидов от 50 % и выше, размер меченых фрагментов от 150 до 700 п. н. Вышеперечисленные показатели су-

щественно влияют на эффективность гибридизации и на отношение сигнал: фон.

Ниже мы приводим хорошо зарекомендовавший себя способ проведения реакции ник-трансляции, а также простые способы оптимизации размеров меченых фрагментов и оценки эффективности мечения зонда.

5.1.1. Мечение ДНК-зондов методом ник-трансляции

Маточные растворы

1. **1 М трис.** Растворить 121,1 г триса в 800 мл H_2O . Довести pH до необходимого значения добавлением концентрированной HCl. Довести объем раствора до 1000 мл.

2. **1 М $MgCl_2$.** Растворить 203,3 г $MgCl_2 \times 6H_2O$ в 800 мл. H_2O . Довести объем до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

3. **1 М дитиотрейтол (ДТТ).** Растворить 3,09 г ДТТ в 20 мл 0,01 М ацетата натрия, pH 5,2. Простерилизовать фильтрованием, разлить на порции по 1 мл и хранить при $-20^\circ C$.

4. **β -меркаптоэтанол.** Обычно выпускается в виде 14,4 М раствора. Хранить в темной бутылки при $+4^\circ C$.

5. **3 М-ацетат натрия.** Растворить 408,1 г ацетата натрия $\times 3 H_2O$ в 800 мл H_2O . Довести pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Довести объем до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

6. **0,5 М ЭДТА.** Добавить 186,1 г динатриевой соли ЭДТА $\times 2 H_2O$ к 800 мл H_2O . Интенсивно размешать на магнитной мешалке. Довести pH до 8,0 с помощью NaOH (~ 20 г NaOH). Довести объем раствора до 1000 мл. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

Состав реакционной смеси

- 5 мкл 10 \times буфера для ник-трансляции (0,5 М Tris-HCl, pH 7,8; 50 мМ $MgCl_2$; 0,5 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА);
- 5 мкл 0,1 М дитиотрейтола (ДТТ);
- 5 мкл 0,1 М β -меркаптоэтанола;
- 4 мкл смеси нуклеотидов (0,5 мМ дАТФ; 0,5 мМ дГТФ; 0,5 мМ дЦТФ; 0,1 мМ дТТФ);
- 2 мкл 1 мМ био-11-дУТФ (или диг-11-дУТФ, флуоресцин-12-дУТФ и др.);

- __мкл (1 мкг) ДНК-пробы;
- __мкл (10 ед.) ДНК-полимеразы I *E. Coli*;
- __мкл (оптимальное количество мкл (см. *Протокол 5.2*) рабочего раствора ДНКазы I*;
- __мкл бидистиллированная вода до конечного объема 50 мкл.

* *Маточный раствор ДНКазы I*: 1 мг ДНКазы I растворить в 1 мл буфера — 0,15 М NaCl и 50 % глицерин, хранить раствор при -20°C .

Рабочий раствор ДНКазы I: готовится разведением маточного в 1000 раз: непосредственно перед использованием 1 мкл маточного раствора добавить к 1 мл холодной ($+4^{\circ}\text{C}$) бидистиллированной воды и перемешать.

Протокол 5.1

1. Приготовить реакционную смесь в эппендорфовой пробирке на льду, ферменты добавлять в последнюю очередь.

2. Смесь перемешать встряхиванием пробирки и быстро осадить центрифугированием.

3. Реакционную смесь инкубировать на водяной бане при $+15^{\circ}\text{C}$ в течение двух часов или при $+10^{\circ}\text{C}$ четыре часа.

4. Остановить реакцию добавлением 5 мкл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0. Выполнение этого пункта не обязательно в том случае, если за п. 3 будет без перерыва следовать п. 5.

5. Добавить к реакционной смеси раствор ДНК-носителя (50 мкг)*, затем добавить 1/10 объема 3 М ацетата натрия, pH 5,5 и 3–5 объемов охлажденного до -20°C 96%-го этанола.

6. Выдержать смесь в течение не менее 30 мин при -70°C или 3 часов при -20°C . При -20°C смесь можно оставить на ночь или более длительный срок.

7. Осадить ДНК центрифугированием при 15 тыс. об/мин в течение 15–20 мин (лучше использовать центрифугу с охлаждением, $+4^{\circ}\text{C}$).

8. Осторожно удалить надосадочную жидкость пипеткой.

9. Добавить к осадку 300–400 мкл охлажденного до -20°C 70%-го этанола, слегка покачать пробирку несколько раз, не переворачивая, и повторно центрифугировать при 15 тыс. об/мин в течение 10 мин.

10. Удалить надосадочную жидкость пипеткой и высушить осадок при $+37^{\circ}\text{C}$. Сухой осадок становится прозрачным.

11. Растворить ДНК в 40 мкл бидистиллированной воды. Конечная концентрация полученной меченной ДНК составляет 20–25 нг/мкл.

12. Приготовленный раствор меченой ДНК можно хранить при -20°C в течение нескольких месяцев.

* В качестве ДНК-носителя рекомендуется использовать фрагментированную ДНК спермы лосося (размер фрагментов от 400 до 1000 п.н.).

5.1.2. Оптимизация размеров меченых фрагментов

Протокол 5.2

1. Приготовить реакционные смеси для ник-трансляции (см. п. 1–2 *Протокола 5.1*), добавив в них разный объем рабочего раствора ДНКазы I — 1; 2,5; 5 и 10 мкл.

2. Провести реакцию как описано в п. 3 *Протокола 5.1*.

3. Отобрать из каждой пробирки аликвоту 10 мкл (200 нг) в новые пробирки, а пробирки, в которых проводилась реакция на время тестирования убрать в холодильник — температура не выше $+4^{\circ}\text{C}$.

4. Денатурировать ДНК, поместив пробирки в кипящую водяную баню на 5 мин.

5. Сразу перенести пробирки в лед. Через 2–3 мин добавить в них 1/10 объема раствора, содержащего: 25 % фиколл, 0,25 % ксиленцианол, 0,25 % бромфеноловый синий.

6. Быстро нанести образцы на 2%-й агарозный гель вместе с маркерами размера ДНК (размеры от 50 до 2000 нуклеотидов) и провести электрофорез, пока бромфеноловый синий не пройдет 2/3 геля. Электрофорез во избежание ренатурации молекул ДНК проводить при напряжении 40–60 В и силе тока 25–30 мА, желательнее в холодном месте.

7. Окрасить гель водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и проанализировать в проходящем УФ-свете. Сравнить размеры ДНК образцов и ДНК маркера. Оптимальный размер зондов составляет 150–700 нуклеотидов.

8. Завершить мечение ДНК-зондов в пробирках с оптимальным размером фрагментов (см. п. 5–12 *Протокола 5.1*).

5.1.3. Оценка эффективности мечения ДНК-зонда

Растворы

1) Раствор $20\times\text{SSC}$, pH 7,0 — 3 М NaCl, 0,3 М цитрат Na.

2) Раствор 4×SSC, pH 7,0 — к 200 мл раствора 20×SSC добавить 800 мл дистиллированной воды.

3) Раствор для отмывок — 4×SSC, 0,2%-й Tween-20.

4) Блокирующий раствор — 1 % блокирующий реагент (Boehringer Mannheim), 4×SSC, 0,2%-й Tween-20. Блокирующий реагент можно заменить BCA (3 %) или обезжиренным сухим молоком (5 %).

5) Инкубационный раствор — 1%-й блокирующий реагент (Boehringer Mannheim), 4×SSC, 0,1%-й Tween-20. Блокирующий реагент можно заменить BCA (1 %) или обезжиренным сухим молоком (5 %), содержащий конъюгат стрептавидин (авидин)-щелочная фосфатаза в разведении, рекомендуемом фирмой-изготовителем.

6) Раствор для щелочной фосфатазы — 0,1 М Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 М NaCl; 10 мМ MgCl₂.

7) Раствор для детекции — раствор для щелочной фосфатазы, содержащий субстраты NBT и BCIP. К 10 мл буфера для щелочной фосфатазы добавить 45 мкл маточного раствора NBT и 35 мкл маточного раствора BCIP.

8) Маточный раствор NBT (нитротетразолий синий) — 75 мг/мл в диметилформамиде.

9) Маточный раствор BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат) — 50 мг/мл в 50%-м диметилформамиде (при использовании калиевой соли BCIP) или воде (при использовании натриевой соли BCIP).

Протокол 5.3

1. Приготовить в лунках иммунологического планшета или на парафильме серию разведений ДНК-зонда от 1 нг/мкл до 0,1 пг/мкл. Для этого нанести в лунки иммунологического планшета или на парафильм по 9 мкл, для первого разведения 9,5 мкл, дистиллированной воды; добавить к первой капле 0,5 мкл раствора меченого зонда (см. п. 11, *Протокол 5.1*), аккуратно перемешать пипетированием; затем из первой капли перенести 1 мкл во вторую каплю и т. д.

2. По 1 мкл из каждого разведения нанести на нейлоновую мембрану и высушить.

3. Облучить мембрану на УФ-трансиллюминаторе в течение 2–3 мин.

4. Поместить мембрану в пластиковую кювету или чашку Петри и залить блокирующим раствором, инкубировать 15 мин при 37 °С.

5. Раствор осторожно слить и залить в кювету инкубационный рас-

твор. Инкубировать 30 мин при 37 °С или согласно рекомендациям производителя.

6. Инкубационный раствор слить и отмыть фильтр при покачивании кюветы в трех сменах раствора для отмывок, по 5 мин в каждой, температура отмывок на 2 °С выше инкубационной.

7. Инкубировать фильтр 5 мин при комнатной температуре в растворе для щелочной фосфатазы.

8. Раствор слить и инкубировать фильтр в растворе для детекции, в темноте при комнатной температуре, до появления четкого синего окрашивания точек. Время окрашивания варьирует от 15 минут до 3 часов.

9. Промыть фильтр в дистиллированной воде и высушить.

10. ДНК-зонд рекомендуется использовать для гибридизации, если 1 пг его определяется данным тестом, однако в случае высокоповторяющихся последовательностей ДНК (сателлитные и альфоидные повторы) выявление 5 пг зонда можно считать достаточным.

5.2. Приготовление препаратов хромосом и интерфазных ядер

Для проведения гибридизации *in situ* пригодны цитологические или гистологические препараты клеток любых тканей или органов, приготовленные по стандартным методикам. В условиях клинической цитогенетической лаборатории используют препараты культивированных лимфоцитов периферической крови, клеток цитотрофобласта хорионального эпителия, культивированных и некультивированных клеток амниотической жидкости, различных тканей из абортного материала, а также мазков клеток буккального эпителия и крови.

Приготовление препаратов хромосом и интерфазных ядер из культивированных лимфоцитов и др. клеток, а также прямых препаратов хромосом и интерфазных ядер из различных тканей описано выше. В данном разделе мы приводим методики приготовления препаратов из других типов клеток.

Протокол 5.4 (приготовление мазков буккального эпителия)

1. На чистом, обезжиренном стекле приготовить мазок из соскоба клеток буккального эпителия, равномерно распределив материал шпателем по стеклу.

2. Высушить препарат на воздухе.

Протокол 5.5 (приготовление мазков крови)

1. На чистом, обезжиренном стекле приготовить мазок из капли периферической крови, равномерно распределив материал по стеклу другим стеклом.

2. Высушить препарат при комнатной температуре.

3. Через 2–3 часа на препарат нанести 1–2 мл охлажденного свежеприготовленного фиксатора (метанол + ледяная уксусная кислота, 3 : 1) на 30–60 сек.

4. Поджечь фиксатор и, не дожидаясь его полного сгорания, погасить пламя.

5. Высушить препарат на воздухе.

5.2.1. Приготовление препаратов некультивированных клеток амниотической жидкости**Растворы**

Гипотонический раствор — 0,56%-й раствор KCl.

Протокол 5.6

1. Образцы амниотической жидкости по 6–8 мл перенести в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин.

2. Осторожно удалить пипеткой надосадочную жидкость, добавить к осадку по 8 мл гипотонического раствора и перемешать.

3. Инкубировать смесь 1,5 часа в термостате при +37 °С.

4. Центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин.

5. Осторожно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

6. Фиксировать материал дважды свежеприготовленным фиксатором (метанол + ледяная уксусная кислота, 3 : 1). Фиксацию проводить при +4 °С, первую в течение 10, вторую — 20 мин.

7. Осадить клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин.

8. Осторожно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

9. К осадку добавить ледяную уксусную кислоту, 8 мл на пробирку, перемешать и выдержать пробирки при + 4 °С 1,5 часа.

10. Осадить клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение

ние 10 мин, и осторожно удалить надосадочную жидкость.

11. Добавить к осадку 6 мл свежеприготовленного фиксатора, перемешать и выдержать смесь 10 мин при +4 °С.

12. Осадить клетки центрифугированием — 1000 об/мин, 10 мин, и осторожно удалить надосадочную жидкость.

13. Добавить к осадку 6 мл охлажденного метанола, перемешать и выдержать смесь 10 мин при +4 °С.

14. Осадить клетки центрифугированием — 1000 об/мин, 10 мин, и осторожно удалить надосадочную жидкость.

15. Добавить к осадку 1,5–2 мл охлажденного метанола и перемешать.

16. Суспензию клеток по 50–100 мкл раскапать на охлажденные чистые и обезжиренные стекла и высушить поджиганием фиксатора.

5.2.2. Приготовление препаратов из эякулята [89, 621]

До приготовления препаратов эякулят можно хранить в темном помещении при температуре +4 °С не более 24 часов.

Растворы

1) Гипотонический раствор — 0,038 М раствор KCl.

2) Раствор для деконденсации хроматина сперматозоидов — 0,2 М TRIS-HCl, pH 8,6, 1,25 % папаина, 0,16 % дитиотрейтола (ДТТ) и 0,5 % диметилсульфоксида (ДМСО).

3) Раствор для отмывки — 0,2 М TRIS-HCl, pH 8,6.

Протокол 5.7

1. Образцы спермы (по 0,5 мл) перенести в центрифужные пробирки, добавить в них по 8 мл гипотонического раствора и перемешать.

2. Инкубировать смесь 30 мин в термостате при +37 °С.

3. Центрифугировать 20 мин при 1500 об/мин.

4. Осторожно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

5. Фиксировать материал свежеприготовленным фиксатором (метанол + ледяная уксусная кислота, 3:1). Первую фиксацию проводить при +4 °С в течение 30 мин. Затем фиксатор сменить трижды, время каждой фиксации — 15–20 мин.

6. Суспензию клеток по 0,1 мл нанести на охлажденные чистые и обезжиренные стекла.

7. Высушить стекла поджиганием фиксатора.
8. Выдержать препараты двое-трое суток при комнатной температуре в сухом темном месте.
9. Инкубировать препараты в растворе для деконденсации при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 мин.
10. Отмыть препараты в растворе для отмывки при комнатной температуре в течение 10 мин при покачивании.
11. Высушить препараты на воздухе.

5.3. Предгибризационная обработка препаратов

Накопленный нами опыт показывает, что для FISH оптимально использовать свежие препараты, приготовленные за двое суток до гибридизации и не подвергавшиеся каким-либо обработкам или окраскам. Однако при необходимости можно использовать окрашенные ранее препараты, мягко (дистиллированная вода, спирты, ксилол) отмытые от красителей, и препараты, приготовленные за несколько месяцев (до двух-трех лет) до гибридизации. Важным условием успешного проведения исследования является минимальное количество цитоплазмы и клеточного детрита на препарате. Ниже приведена легко воспроизводимая методика обработки препаратов перед гибридизацией. Ее можно использовать для предгибризационной обработки препаратов всех типов клеток, приготовленных прямыми методами или после культивирования, а также мазков клеток буккального эпителия и крови.

Растворы

- 1) Раствор РНКазы А.

Маточный раствор — 10 мг РНКазы А растворить в 1 мл $2\times\text{SSC}$, поместить пробирку в кипящую водяную баню на 10 мин и охладить до комнатной температуры. Расфасовать по 15 мкл и хранить раствор при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 2) Рабочий раствор РНКазы (готовить непосредственно перед употреблением) — к 985 мкл раствора $2\times\text{SSC}$ добавить 15 мкл маточного раствора РНКазы А.

- 3) Раствор $20\times\text{SSC}$, pH 7,0 — 3 М NaCl, 0,3 М цитрат Na.

- 4) Раствор $2\times\text{SSC}$, pH 7,0 — к 100 мл раствора $20\times\text{SSC}$ добавить 900 мл дистиллированной воды.

5) Раствор 10×PBS, pH 7,0.

6) Раствор А: в 900 мл дистиллированной воды растворить 16,02 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 73,84 г NaCl . Раствор Б: в 200 мл дистиллированной воды растворить 2,76 г NaN_2PO_4 и 16,56 г NaCl . Довести pH раствора А до 7,0 с помощью раствора Б.

7) Раствор пепсина (использовать пепсин с активностью 3000–4000 ед., например, Sigma, Р 6886).

Маточный раствор — 10%-й водный раствор пепсина на дистиллированной воде. Расфасовать по 100 мкл и хранить при -20°C .

8) Рабочий раствор — непосредственно перед использованием 60–100 мкл маточного раствора пепсина добавить к 100 мл 0,01 М HCl . Раствор перемешать.

9) 0,01 М HCl — к 100 мл предварительно нагретой до $+37^\circ\text{C}$ дистиллированной воды добавить 85 мкл концентрированной HCl . Раствор перемешать.

10) Раствор параформальдегида (1%-й или 4%-й), готовить непосредственно перед употреблением:

- к 1 или 4 г параформальдегида добавить 80 мл дистиллированной воды и 7 (или 20) мкл 5 N NaOH , растворить при $+50$ – 60°C при покачивании;
- добавить к раствору 10 мл 10×PBS и 1 мл 5 М раствора MgCl_2 (конечная концентрация 50 mM);
- охладить раствор до комнатной температуры;
- при необходимости довести pH до 7,0 концентрированной HCl (4–10 мкл);
- довести объем раствора до 100 мл дистиллированной водой.

11. Раствор для денатурации — 70 %-й деионизированный формамид*, 2×SSC, pH 7,0 (70 мл деионизированного формамида; 10 мл 20×SSC, pH 7,0; H_2O до 100 мл).

* Деионизация формамида: к 100 мл формамида добавить 10 г ионообменной смолы AG 501-X8, ячейка 20–50 (Bio-Rad), и перемешивать смесь на магнитной мешалке в течение нескольких часов. Затем несколько раз профильтровать смесь через фильтровальную бумагу ватман № 1. Профильтрованный формамид рекомендуется хранить в плотно закрытой стеклянной или пластиковой посуде.

Протокол 5.8

1. Выдержать препараты 1 час при +60 °С.
2. Дегидратировать препараты в серии спиртов (70°, 80°, 96° этанол) по 5 мин в каждом.
3. Высушить препараты на воздухе.
4. Нанести на препараты по 100 мкл рабочего раствора РНКазы А, накрыть покровными стеклами 22×50 мм. Обработку препаратов проводить во влажной камере в термостате при +37 °С в течение 1 часа. Если в качестве ДНК-зондов будут использоваться последовательности рДНК или другие последовательности, уровень экспрессии которых в исследуемой ткани высок, рекомендуется увеличить продолжительность этапа до 2–3 часов.
5. Отмыть препараты при комнатной температуре в трех сменах 2×SSC и затем при +37 °С в 1 смене 1×PBS, по 5 мин в каждой смене, при покачивании.
6. Обработать препараты в стакане с рабочим раствором пепсина при +37 °С в течение 10 мин. Препараты клеток с плотной оболочкой (амнициты, буккальный эпителий, сперматозоиды и др.) обрабатывать 40–50 мин. Мазки крови обрабатывать не больше 1–2 мин или совсем исключить обработку.
7. Отмыть препараты в растворе 1×PBS в течение 5 мин при комнатной температуре, при покачивании.
8. Фиксировать материал, поместив препараты в стакан с 1 %-м раствором параформальдегида на 10–15 мин. Для препаратов мазков крови или гистологических срезов использовать 4%-й раствор параформальдегида.
9. Отмыть препараты в течение 5 мин в растворе 1×PBS при комнатной температуре, при покачивании.
10. Дегидратировать препараты в серии спиртов (70°, 80°, 96° этанол) по 5 мин в каждом.
11. Высушить препараты на воздухе.
12. Денатурировать ДНК хромосом при +70–72 °С 2 мин, поместив препараты в стакан (кювету) с раствором для денатурации. Для клеток с плотной оболочкой продолжительность обработки и температуру увеличить — например, для клеток буккального эпителия оптимально — 25 мин. при +76–80 °С.
13. Быстро перенести препараты в охлажденный до –20 °С 70%-й

раствор этанола на 2 мин.

14. Дегидратировать препараты в серии охлажденных до -20°C спиртов (70° , 80° , 96° этанол) по 5 мин в каждом.

15. Высушить препараты на воздухе.

16. Обработанные препараты сразу использовать для гибридизации или в течение нескольких дней хранить при $+4^{\circ}\text{C}$ в коробке с осушителем.

Примечание

Все процедуры отмывок препаратов рекомендуется проводить в стаканах или кюветах для проводок на водяной бане-качалке.

5.4. Гибридизация *in situ*

Состав гибридизационной смеси и температурный режим являются параметрами, от которых зависит специфика гибридизации молекул ДНК-зонда с ДНК-мишени (хромосомной ДНК). Поэтому в зависимости от нуклеотидного состава и числа копий исследуемой последовательности ДНК, а также задач, поставленных исследователем, могут изменяться: состав гибридизационной смеси (добавление или исключение некоторых компонентов — декстран сульфат, неионные детергенты и т. д.), содержание денатурирующего реагента — формамида (от 0 до 60 %) или концентрация солевых буферов (от 2 до $0,1\times\text{SSC}$) и температурный режим проведения гибридизации (от $+37$ до $+42^{\circ}\text{C}$). В данной главе приведены два Протокола, которые наиболее часто используются для диагностических целей в нашем центре.

5.4.1. Гибридизация *in situ* с ДНК-зондами на основе высоко-(умеренно) повторяющихся последовательностей и уникальных последовательностей, не содержащих большого количества интерсперсных повторов.

Растворы

1. *Состав гибридизационного раствора для гибридизации сателлитных и альфондных повторов** (конечная концентрация формамида 55 %):

10 мкл — общий объем

■ 7 мкл — гибридизационный буфер №1

- ___ мкл — ДНК-зонд (10–30 нг)
- ___ мкл — ДНК-носитель (20–50-кратный избыток по сравнению с ДНК-зондом)
- ___ мкл дистиллированной воды до 10 мкл

*Проведение гибридизации в данном растворе при температуре +37 °С соответствует условиям средней жесткости, позволяющим выявлять специфические для отдельных хромосом участки альфоидных последовательностей ДНК (исключение — хромосомы 13 и 21, 14 и 22, имеющие гомологичные участки альфоидной ДНК, подробнее см. [235]).

2. *Состав гибридизационного раствора для гибридизации умеренных повторов* (конечная концентрация формамида 50 %):

10 мкл — общий объем

- 7 мкл — гибридизационный буфер №2
- ___ мкл — ДНК-зонд (20–40 нг)
- ___ мкл — ДНК-носитель (50-кратный избыток по сравнению с ДНК зонда)
- ___ мкл дистиллированной воды до 10 мкл.

3. *Состав гибридизационного раствора для гибридизации уникальных последовательностей* (конечная концентрация формамида 50 %):

10 мкл — общий объем

- 7 мкл — гибридизационный буфер №2
- ___ мкл — ДНК-зонд (100–200 нг)
- ___ мкл — ДНК-носитель (500-кратный избыток по сравнению с ДНК зонда)
- ___ мкл дистиллированной воды до 10 мкл.

Приготовление гибридизационных буферных растворов

Буфер №1 — смешать в пробирке 10 г декстран сульфата, 1 мл 20×SSC, 5,5 мл деионизированного формамида и довести объем би-дистиллированной водой до 7 мл; смесь растворить при +40 °С на шейкере; профильтровать через фильтр с диаметром пор 45 мкм. Готовый буфер хранить при –20 °С.

Буфер №2 — приготовление и состав такие же, как для буфера №1, за исключением объема формамида — 5 мл.

Протокол 5.9

1. Приготовить в эппендорфовой пробирке гибридизационный раствор, смешав растворы меченой пробы (проб) и ДНК-носителя с нагретым до +37 °С гибридизационным буфером.

2. Денатурировать пробу, поместив пробирку с гибридизационным раствором на кипящую водяную баню на 5–10 мин.

3. Быстро перенести пробирку на лед. Не рекомендуется оставлять денатурированный зонд на льду более 30 мин.

4. Нанести гибридизационный раствор на предварительно нагретые до 37–38 °С препараты — по 10 мкл под покровное стекло 22×22 мм, и заклеить по периметру края покровных стекол резиновым клеем. Поместить препараты в предварительно нагретую до +37–38 °С влажную камеру.

5. Инкубировать препараты 12–18 часов (ночь) при +37–38 °С.

Примечания

1) Если целью исследования является одновременное выявление двух и более последовательностей ДНК, в гибридизационный раствор следует добавить одновременно несколько проб, меченных по-разному модифицированными нуклеотидами. Концентрацию ДНК-носителя при этом пропорционально увеличить.

2) Если общий объем растворов меченой пробы и ДНК-носителя будет больше 30 % объема гибридизационного раствора, то один из них или оба (растворы меченой пробы и ДНК-носителя) высушить с помощью лиофильной сушки или в термостате при +37 °С.

5.4.2. Супрессорная гибридизация *in situ*

Метод используется для гибридизации с большеразмерными ДНК-зондами, содержащими значительное количество интерсперсных повторающихся последовательностей (ИПП) (например, геномными последовательностями, клонированными в космидах или YAC, цельнохромосомными и локус-специфическими пробами разной природы).

Основное отличие данного Протокола от *Протокола 5.9* — дополнительный этап предгибридизации (супрессии) ДНК-зонда с конкурентной ДНК, что необходимо для предотвращения перекрест-

ной гибридизации зонда с ДНК хромосом, не являющейся мишенью, но содержащей ИПП. В качестве конкурентной ДНК можно использовать фрагментированную тотальную геномную ДНК (размер фрагментов 400–800 п. н.) или ДНК высокоповторяющейся фракции генома - Cot1, последнее более эффективно.

Состав гибридизационного раствора (конечная концентрация формамида 50 %):

10 мкл — общий объем

■ 7 мкл — гибридизационный буфер № 2 см. *Протокол 5.9*

■ ___ мкл — ДНК-зонд (50–100 нг)

■ ___ мкл — конкурентная ДНК (1–5 мкг, до 8 мкг)

■ ___ мкл — ДНК-носитель (суммарное количество конкурентной ДНК и ДНК-носителя должно составлять 10 мкг)

■ ___ мкл дистиллированной воды до 10 мкл

Примечание

Общее количество ДНК в гибридизационном растворе не должно превышать 30 мкг.

Протокол 5.10

1. Приготовить в эппендорфовой пробирке гибридизационный раствор*.

2. Денатурировать пробу, поместив пробирку с гибридизационным раствором на кипящую водяную баню на 5–10 мин.

3. Быстро перенести пробирку в термостат на +37 °С и инкубировать 10–50 мин. Продолжительность инкубации зависит от количества ИПП в ДНК-зонде, размера ДНК-мишени (хромосомы или хромосомного участка) и степени гомологии исследуемой ДНК с ДНК других участков хромосом.

4. Нанести гибридизационный раствор (10 мкл под покровное стекло 22×22 мм), на предварительно нагретые до 37–38 °С препараты, заклеить по периметру края покровных стекол резиновым клеем и поместить их во влажной камере в термостат.

5. Инкубировать препараты 12–18 часов (ночь) при +37–38 °С.

*См. примечания к *Протоколу 5.9*.

5.4.3. Постгибризационные отмывки препаратов

Постгибризационные отмывки необходимы для удаления с препаратов молекул ДНК-зонда не специфически связавшихся с хромосомной ДНК. От точности проведения этого этапа во многом зависит общий результат диагностики, так как неспецифическая «фоновая» гибридизация затрудняет, а иногда делает невозможным корректный анализ препаратов после FISH. С целью выявления на хромосомах или в интерфазных ядрах последовательностей, гомологичных последовательностям ДНК-зонда, отмывки проводят при той же концентрации формамида, что и гибридизацию, а температура на 5 °С выше, чем гибридизационная. О возможных вариантах и целях отмывок разной степени жесткости см. в работах [533, 818]. Ниже мы приводим стандартный Протокол постгибризационных отмывок.

Протокол 5.11

1. Осторожно удалить резиновый клей.
2. Поместить препараты в стакан с раствором 50 % (55 %) формамид — 2×SSC, рН 7,0, при +43 °С. Через 3–5 мин аккуратно удалить покровные стекла.
3. Отмыть препараты в трех сменах раствора формамид 50 % (55 %) — 2×SSC рН 7.0 по 5 мин в каждом при +43°С.
4. Отмыть препараты в трех сменах раствора 2×SSC по 5 мин в каждом, при +43 °С.
5. Отмыть препараты 5 мин в растворе 0,2×SSC, при +43 °С.

Примечания

- 1) Для отмывок используется раствор формамида той же концентрации, которую применяли для гибридизации. Формамид деионизировать не обязательно, рН при необходимости подвести до 7,0 концентрированной HCl.
- 2) Отмывки рекомендуется проводить в стаканах или кюветах для проводок на водяной бане-качалке.

5.4.4. Флуоресцентная детекция гибридных молекул

Гибридные молекулы можно выявлять с помощью различных сис-

тем иммунохимической детекции, используя флуорохромы-детекторы разных цветов, это делает возможным выявление одновременно нескольких последовательностей ДНК в одной клетке. Ниже мы приводим два хорошо зарекомендовавших себя способа детекции гибридационных сигналов. Первый — «одноцветный» (*Протокол 5.12*) используется для детекции гибридных молекул после гибридизации *in situ*, проведенной с ДНК-зондом, меченным биотином, второй — «двухцветный» (*Протокол 5.13*) для детекции продуктов гибридизации, проведенной одновременно с двумя ДНК-зондами (детекция биотина и дегюксигенина).

Растворы

1. Раствор 4×SSC, pH 7,0 — к 200 мл раствора 20×SSC добавить 800 мл дистиллированной воды.

2. Раствор для отмывок — 4×SSC, 0,2 %-й Tween-20.

3. Блокирующий раствор — 1%-й блокирующий реагент (Boehringer Mannheim), 4×SSC, 0,1%-й Tween-20. Блокирующий реагент можно заменить БСА (3 %) или обезжиренным сухим молоком (5 %).

4. Раствор для детекции — 1 %-й блокирующий реагент (Boehringer Mannheim) 4×SSC, 0,1%-й Tween-20. Блокирующий реагент можно заменить БСА (1 %) или обезжиренным сухим молоком (5 %), содержащий соответствующий конъюгат-детектор. Раствор приготовить в эппендорфовой пробирке за 20–30 мин. до использования, хорошо перемешать и оставить до момента нанесения при комнатной температуре в темноте, перед нанесением раствор еще раз перемешать и быстро осадить центрифугированием.

Протокол 5.12

1. Препараты из раствора 0,2×SSC, стряхнув с них жидкость, поместить на нагревательный столик.

2. Нанести на препараты по 150 мкл блокирующего раствора и накрыть покровными стеклами 24×50 мм (при использовании стекол другого размера соответственно изменить объем наносимого раствора).

3. Инкубировать препараты 20–30 мин во влажной камере в термостате при +37 °С.

4. Осторожно (стряхиванием) удалить покровные стекла.

5. Влажные препараты немедленно поместить в прогретую

до $+37^{\circ}\text{C}$ влажную камеру или на нагретый до этой же температуры нагревательный столик и нанести на них по 80–100 мкл раствора для детекции, содержащего конъюгат авидин-FITC в концентрации 5 мкг/мл, сверху накрыть покровными стеклами 24×50 мм. Препараты инкубировать 30–40 мин во влажной камере в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$.

6. Осторожно удалить покровные стекла, отмыть препараты в трех сменах раствора для отмывок по 5 мин в каждой смене, при $+43^{\circ}\text{C}$, при покачивании.

7. Быстро перенести препараты во влажную камеру или на нагревательный столик и нанести на них 80–100 мкл раствора для детекции, содержащего биотинилированный антиавидин D в концентрации 5 мкг/мл, накрыть покровными стеклами 24×50 мм. Препараты инкубировать 30–40 мин во влажной камере в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$.

8. Повторить п. 6 данного Протокола.

9. Повторить п. 5 данного Протокола. Продолжительность инкубации можно уменьшить до 20–25 мин.

10. Повторить п. 6 данного Протокола.

11. Сполоснуть препараты в стакане с $14\times\text{SSC}$, 0,1%-й Tween-20PBS, а затем в стакане с дистиллированной водой. Можно использовать только дистиллированную воду — две смены.

12. Дегидратировать препараты в серии спиртов (70 %, 80 %, 96 % этанол) по 5 мин в каждом.

13. Высушить препараты на воздухе.

Примечания

1. Все процедуры отмывок препаратов рекомендуется проводить в стаканах или кюветах для проводок на водяной бане-качалке.

2. При проведении всех этапов детекции поверхность препаратов не должна подсыхать.

3. Этапы Протокола, начиная с п. 5, рекомендуется проводить в затемненном помещении. Категорически недопустима работа в ярко освещенном помещении.

4. Если нет необходимости в усилении гибридизационных сигналов (например, при использовании в качестве зонда сателлитных последовательностей ДНК), этапы иммунохимической амплификации флуоресцентных сигналов (пп. 7–9), можно исключить. После п. 6 перейти к выполнению пп. 11–13.

Протокол 5.13

1–6. См. п. 1–6 *Протокола 5.12.*

7. Быстро перенести препараты из последней смены отмывок во влажную камеру или на нагревательный столик, и нанести на них по 80–100 мкл раствора для детекции, содержащего биотинилированный антиавидин D в концентрации 5 мкг/мл и мышинные моноклональные антитела к дигоксигенину в разведении, рекомендуемом фирмой-изготовителем, накрыть покровными стеклами 24×50 мм. Препараты инкубировать 30–40 мин во влажной камере при +37 °С.

8. См. п. 6 *Протокола 5.12.*

9. Не давая препаратам полностью высохнуть, нанести по 80–100 мкл раствора для детекции, содержащего конъюгат авидин-FITC в концентрации 5 мкг/мл и кроличьи антитела к IgG мыши, конъюгированные с TRITC, в разведении, рекомендуемом фирмой-изготовителем, накрыть покровными стеклами 24×50 мм. Препараты инкубировать 30 мин во влажной камере при +37 °С.

10. См. п. 6 *Протокола 5.12.*

11. На влажные препараты нанести по 80–100 мкл раствора для детекции, содержащего козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с TRITC, в концентрации, рекомендуемой фирмой-изготовителем. Накрыть покровными стеклами 24×50 мм, инкубировать 20–30 мин во влажной камере при +37 °С.

12. См. п. 7 *Протокола 5.12.*

13–15. См. пп. 11–13 *Протокола 5.12.*

Примечание

Условия проведения процедуры см. в *Протоколе 5.12.*

5.4.4.1. Окраска и заключение препаратов

После детекции гибридных молекул препараты окрашивают флуоресцентными красителями и заключают в фотозащитный раствор. Первая процедура позволяет наблюдать флуоресцентные сигналы непосредственно на окрашенных хромосомах, интерфазных ядрах, клетках и т. д., что облегчает анализ полученных результатов. Вторая — защищает флуорохромы от выгорания. Окраска и заключение могут быть проведены раздельно или одновременно. В последнем случае краситель добавляют в

фотозащитный раствор. Нам кажется более удобным второй способ, один из вариантов которого мы приводим ниже.

Если для детекции гибридных молекул использовали FITC, в фотозащитный раствор добавляют растворы пропидиум йодида и DAPI. Если проводили «двухцветную» детекцию, используя FITC и TRITC, в фотозащитный раствор следует добавить только раствор DAPI.

Растворы

1. Фотозащитный заключающий раствор:

- к 0,23 г 1,4-дiazобисцикло-(2,2,2)-октана (DABCO) добавить 1 мл 0,2 М Tris-HCl, pH 7,5 и перемешать покачиванием или пипетированием;
- добавить 9 мл 95–99%-го глицерина;
- растворить смесь при +70 °С (на шейкере или пипетированием); когда раствор станет гомогенным, оставить его на несколько часов или на ночь при комнатной температуре;
- подогреть раствор до +40 °С и профильтровать через фильтр с диаметром пор 45 мкм;
- расфасовать раствор по 1–2 мл и хранить при –20 °С.

2. Раствор DAPI.

Маточный раствор: 1 мг/мл на дистиллированной воде, хранить при –20 °С.

3. Раствор пропидиум йодида.

Маточный раствор: 1 мг/мл на дистиллированной воде, хранить при –20 °С.

4. Фотозащитный заключающий раствор, содержащий DAPI: (0,5–1 мкг/мл в заключающем растворе):

- 0,5–1 мкл маточного раствора красителя осторожно нанести на стенку эппендорфа с 1 мл заключающего раствора; быстро осадить центрифугированием;
- осторожно 5–6 раз перемешать пипетированием и быстро осадить центрифугированием;
- раствор хранить при –20 °С до полугода;
- перед нанесением на препарат выдержать раствор 20–30 мин в темном месте, при +37 °С.

5. Фотозащитный заключающий раствор, содержащий пропидиум йодид: 0,5–1 мкг/мл в заключающем растворе; приготовление см. Фо-

тозащитный заключающий раствор, содержащий DAPI.

6. Фотозащитный заключающий раствор, содержащий пропидиум йодид и DAPI: добавлять оба красителя в заключающий раствор одновременно в указанных выше концентрациях; приготовление см. Фотозащитный заключающий раствор, содержащий DAPI.

Протокол 5.14

1. Нанести на препараты по 40–45 мкл заключающего раствора, содержащего флуоресцентный краситель (красители), накрыть покровными стеклами размером 24×50 или 24×60 мм (при использовании стекол другого размера соответственно изменить объем наносимого раствора).

2. Окрашивать препараты 20–30 мин при комнатной температуре или ночь в холодильнике при +4 °С.

Примечание

Заключение проводить сразу после завершения процедуры флуоресцентной детекции, когда препараты высохнут, см. *Протокол 5.12, 5.13*

5.4.4.2. Микроскопия

Анализ препаратов после FISH проводят с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного набором соответствующих светофильтров. В таблице приведены возможные варианты наборов одиночных, двойных и тройных светофильтров, которые можно использовать для визуализации флуорохромов, описанных в данном разделе.

Флуорохром	Цвет флуорохрома	Возбуждающий фильтр	Светоделительная пластинка	Запирающий фильтр
DAPI	голубой	365	395	397
Пропидиум йодид	темно-красный	546	580	590
Пропидиум йодид	ярко-красный	460–490	510	520
FITC	желто-зеленый	460–490	510	520
TRITC	розовый	460–490	510	520
TRITC	красный	546	580	590
FITC/TRITC	желто-зеленый/ розовый	485 и 546	440/505	515–530 и 580–630
DAPI/ FITC/TRITC	зеленый/ желтый/ малиновый	400/495/570	410/505/585	460/530/610

5.4.5. Хранение препаратов после FISH

Заклученные в фотозащитный раствор препараты следует хранить при +4 °С в закрытой коробке. При правильном проведении всех этапов FISH проанализированные препараты могут храниться 2–3 года и более. При необходимости, если морфология хромосом (интерфазных ядер, клеток) сохранилась, а флуоресцентные сигналы стали слабыми, можно аккуратно бритвой или скальпелем снять покровные стекла, отмыть препараты в нескольких сменах дистиллированной воды, дегидратировать в серии спиртов и усилить гибридизационные сигналы (пп. 5–12 *Протокола 5.12*), а затем заключить препараты как описано в *Протоколе 5.14*.

6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ХРОМОСОМНЫХ РАЙОНОВ

6.1. Ag-окраска активных ядрышкообразующих районов хромосом

Для специфического выявления активных районов ядрышковых организаторов (ЯОР), локализованных в коротких плечах акроцентрических хромосом человека, используют метод окраски нитратом серебра с желатиной. Интенсивно окрашиваются в черный цвет лишь те ЯОР, которые были активны в предшествующей интерфазе. Неактивные ЯОР при этом способе не детектируются. Благодаря ярко выраженному полиморфизму, ЯОР могут быть использованы для характеристики индивида и для установления родительского происхождения дополнительных акроцентрических хромосом при гетеропloidии.

Растворы

1. 50%-й раствор азотнокислого серебра на деионизированной (можно на бидистиллированной) воде.
2. 2%-й раствор желатина на дистиллированной воде.
3. Муравьиная кислота.
4. 5%-й раствор гипосульфита натрия.

Протокол 6.1

1. На препарат под каждое покровное стекло 24×24 мм нанести 2 капли смеси желатина и муравьиной кислоты (1 мл кислоты на 100 мл желатины, смешивать непосредственно перед употреблением) и 1 каплю (50–60 мкл) раствора серебра.

2. Инкубировать во влажной камере при 37 °С 20–60 мин, контролируя интенсивность окраски визуально и под микроскопом.

3. По окончании окрашивания (потемнение до серо-коричневого цвета красящей смеси и светлые желто-коричневые ядра на препарате) смыть покровные стекла проточной водой и поместить препараты на 30 сек в гипосульфит натрия.

4. Промыть проточной водой и высушить.

5. Для анализа в проходящем свете препараты можно докрасить раствором красителя Гимза, используя рутинный (*Протокол 2.1*) или G-метод (*Протоколы 3.1, 3.2, 3.4*). При анализе ЯОР-препаратов, окрашенных с помощью QFH-метода, необходимо комбинирование люминесцентного и проходящего освещения.

Примечания

1. При переокрашивании препарата (окрашивание хромосом в коричневый цвет) инкубирование в гипосульфите можно продолжить, увеличив его концентрацию в растворе. Можно использовать с этой целью насыщенный раствор красной кровяной соли.

2. Успешное окрашивание существенно зависит от партии всех используемых реактивов.

3. На всех этапах следует соблюдать крайнюю осторожность, т. к. пятна серебра не поддаются полному удалению с оптики, одежды и пр.

6.2. Выявление районов, обогащенных 5-метилцитозином

Возможно двумя методами: рестрикцией с последующей нуклеотидной трансфекцией *in situ* или прямой детекцией 5-метилцитозина с помощью специфичных антител.

6.2.1. Ник-трансляция *in situ*

6.2.1.1. Рестрикция

В качестве преобработок перед ник-трансляцией инкубировать препараты метафазных хромосом с эндонуклеазами рестрикции MspI и HpaII. Рестриктазы являются изошизомерами и вносят разрывы в последовательности C↓CGG, при этом HpaII в отличие от MspI расщепляет сайт, если внутренний цитозин не метилирован.

Протокол 6.2

1. Провести обработку препаратов рестриктазами во влажной камере при 37 °С в течение 45 мин. Под покровные стекла 22×50 нанести инкубационную смесь, состоящую из 50 мкл буферного раствора для MspI (Promega) или HpaII (Promega) и фермента в концентрации 0,25 ед/мкл.

2. Препараты отмыть в 1×PBS с 0,5 М ЭДТА 5–10 минут, затем в 1×PBS и высушить на воздухе.

6.2.1.2. Реакция ник-трансляции *in situ* [143]

Протокол 6.3

1. На препараты под покровные стекла 22×50 нанести по 60 мкл буфера для ник-трансляции, содержащий 10 мМ ДТТ, 0,5 М Tris-HCl (pH 7,6), 50 мМ MgCl₂, Dig-11-dUTP (20 мкмоль) (Boehringer Mannheim), дАТФ, дГТФ, дЦТФ (по 20 мкмоль каждого), дТТФ (5 мкмоль) (СибЭнзим), ДНК-полимеразу I (0,01 ед/мкл), свободную от ДНКазной активности (Boehringer Mannheim), и инкубировать при 17 °С в течение 40 мин.

2. Отмыть препараты в 5%-й трихлоруксусной кислоте при 4 °С 1 мин.

3. Отмыть в специальном буферном растворе (1 М Tris-HCl, 4 М NaCl, 2,5 М MgCl₂) в течение 10 мин и в 1×PBS 5 мин.

4. Ополоснуть в дистиллированной воде и, не высушивая, нанести блокирующий раствор (Boehringer Mannheim) на 1×PBS и инкубировать 30 мин при 37 °С.

5. Детекцию дигоксигенина провести с использованием антидигоксигенин-флюоросцеина в концентрации 80 мкг/мл (Boehringer Mannheim) 60 мин при 37 °С.

6. Отмыть в трех сменах 1×PBS с 0,1 % Tween-20, ополоснуть в дистиллированной воде и высушить на воздухе. Препараты заключить в фотозащитный раствор, содержащий DABCO и красители ДАПИ (1 мкг/мл) и пропидиум йодид (0,5 мкг/мл).

Примечание

Для контроля специфичности реакции используют препараты:

а) инкубированные в буферном растворе без ферментов MspI или HpaII с последующей ник-трансляцией и детекцией ник-трансляционного сигнала;

б) инкубированные в буферном растворе для ник-трансляции без ДНК-полимеразы I, после предварительной обработки хромосом ферментами и последующей детекцией ник-трансляционного сигнала.

6.2.1.3. Анализ препаратов

Включение dig-11-УТР регистрируют по распределению флуоресцентных сигналов. Идентификацию хромосом проводят с помощью дифференциального окрашивания DAPI.

Анализ препаратов проводят на универсальных микроскопах, например:

1. ЛЮАМ РПО 11 (ЛОМО), оборудованном объективами CX 20×/0,45 и М-флюар 100×/1,30, тубусной оптикой с линзами от 1,1^x до 1,6^x, черно-белой CCD-камерой накопления сигнала (Chiper);

2. DMRXA (Leica), оборудованном объективами FLUOTAR 40×/0,70 и 100×/1,30, автоматической фотонасадкой, черно-белой CCD-камерой накопления сигнала (Cohu) в проходящем свете и с помощью блока светофильтров для флуорохромов FITC, DAPI и йодистого пропидия.

6.2.2. Иммунофлуоресцентный метод детекции 5-метилцитозина на препаратах метафазных хромосом с помощью моноклональных антител

Протокол 6.4 [71]

1. Препараты метафазных хромосом денатурировать в растворе 2 М HCl в течение 25–30 мин при комнатной температуре.

2. Провести через ледяной 1×PBS (pH 7,2–7,4), две смены 1×PBS

(рН 7,2–7,4) и две смены дистиллированной воды (по 2 мин) при комнатной температуре и высушить на воздухе.

3. На препараты нанести по 100 мкл блокирующего раствора (Boehringer Mannheim) на 1×PBS (рН 7,2–7,4) (под покровное стекло 24×60) и инкубировать 40 мин во влажной камере при температуре +37 °С.

4. На влажные препараты под покровные стекла 24×60 нанести по 100 мкл раствора моноклональных антител к 5-метилцитозину (Eurogentec), разведенных в блокирующем растворе (Boehringer Mannheim) в соотношении 1:500, и инкубировать 60 мин во влажной камере при комнатной температуре в отсутствии света.

5. Препараты отмыть в трех сменах 1×PBS (рН 7,2–7,4), содержащего 0,5 % Tween 20, по 3 мин в каждой, на водяной бане при температуре 43 °С.

6. На влажные предметные стекла нанести раствор моноклональных антител, конъюгированные с FITC (anti-mouse FITC, Sigma), разведенных в блокирующем растворе (Boehringer Mannheim) в соотношении 1:50 (под покровное стекло 24×60), и инкубировать 60 мин во влажной камере при температуре +37 °С.

7. Препараты отмыть в трех сменах 1×PBS (рН 7,2–7,4), содержащего 0,5 % Tween 20, по 3 мин в каждой, на водяной бане при температуре 43 °С.

8. Препараты ополоснуть в 1×PBS (рН 7,2–7,4) и дистиллированной воде, провести через серию спиртов 70°, 80°, 96° при комнатной температуре и высушить на воздухе.

9. Препараты заключить под покровные стекла 24×60 в фотозащитный раствор, содержащий DABCO, красители пропидиум йодид и DAPI в концентрации 1мкг/мл.

6.2.2.1. Анализ препаратов

Связывание антител регистрируют по распределению флуоресцентных сигналов.

Анализ препаратов проводят с помощью микроскопа DMLS (Leica), оборудованного объективами FLUOTAR 20×/0,40 и 100×/1,30–0,60, автоматической фотонасадкой, цветной камерой Leica DFC 320, блоком светофильтров для флуорохромов FITC, DAPI и йодистого пропидия. Для получения видеоизображения используют программное обеспе-

чение Leica DFC Twain. Для анализа видеоизображения используют программное обеспечение Adobe Photoshop 7.0.

7. ПРОПИСИ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

7.1. Стандартный фосфатный буфер Соренсена (рН 6,8)

Раствор 1. 1/15 М Na_2HPO_4 (23,8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, или 11,8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, дистиллированная вода до 1000 мл).

Раствор 2. 1/15 М KH_2PO_4 (9,1 г, дистиллированная вода до 1000 мл).
Смешать перед употреблением в соотношении 1:1.

7.2. Буферный раствор GKN, рН 7,8 (10-кратный)

- глюкоза (D+) — 550 мМ (98,0 г)
- KCl — 540 мМ (4,0 г)
- NaCl — 13,7 М (80,0 г)
- Na_2CO_3 — 40 мМ (4,2 г)

Дистиллированная вода до 1000 мл

Маточный раствор GKN расфасовать по 15–20 мл и хранить при -20°C .

Перед употреблением развести в 10 раз.

Для получения рН 9,0 использовать 0,1 N NaOH.

Для получения рН 7,0 использовать 0,1 N HCl.

7.3. Буферный раствор SKN, рН 7,8

- сахароза — 6,6 мМ (2,26 г)
- KCl — 54 мМ (0,4 г)
- NaCl — 1,37 М (8,0 г)
- Na_2CO_3 — 4 мМ (0,42 г)

Дистиллированная вода до 1000 мл

Для получения рН 9,0 использовать 0,1 N NaOH.

Для получения рН 7,0 использовать 0,1 N HCl.

7.4. Буферные растворы SSC

7.4.1. 20×SSC:

- 3 М NaCl (174 г)
- 0,03 М цитрат Na (88,2 г безводной соли)

Растворить в 800 мл дистиллированной воды. Довести pH до 7,0 с помощью 1 N HCl, добавить воды до 1000 мл.

7.4.2. 2×SSC

- 0,3 М NaCl
- 0,003 М цитрат Na

Рекомендуется приготовление из 20×SSC: к 100 мл раствора добавить 900 мл воды.

7.4.3. 4×SSC

- 0,6 М NaCl
- 0,006 М цитрат Na

Рекомендуется приготовление из 20×SSC: к 200 мл раствора добавить 800 мл воды.

7.5. Раствор версена

- NaCl — 0,137 М (8,0 г)
- KCl — 2,68 мМ (0,20 г)
- Na₂HPO₄ — 8,06 мМ (2,89 г Na₂HPO₄ · 12 H₂O)
- KH₂PO₄ — 1,47 мМ (0,20 г)
- Na₂ЭДТА — 1 мМ (0,372 г)

Дистиллированная вода до 1000 г

7.6. Na-фосфатный буфер (0,01 М)

Раствор 1. 0,1 М Na₂HPO₄ (35,8 г Na₂HPO₄ × 12 H₂O, вода до 1000 мл)

Раствор 2. 0,1 М NaH₂PO₄ (15,6 г NaH₂PO₄ × 2 H₂O, вода до 1000 мл)

Растворы хранить отдельно. Перед употреблением смешать по 5 мл и довести объем до 100 мл дистиллированной водой.

7.7. Насыщенный солевой буферный раствор Дюльбекко, pH 7,2:

Раствор 1.

- NaCl — 0,137 М (8,0 г)

- KCl — 2,68 мМ (0,20 г)
- Na_2HPO_4 — 8,06 мМ (2,89 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)
- KH_2PO_4 — 1,47 мМ (0,20 г)

Дистиллированная вода до 1000 г

Раствор 2. CaCl_2 — 0,006 М (1,0 г $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды)

Раствор 3. MgCl_2 — 0,005 М (1,0 г $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды)

Растворы хранить отдельно. Перед употреблением к 160 мл раствора 1 добавить по 20 мл растворов 2 и 3.

7.8. Цитратно-фосфатный буфер Мак-Ильвейна

Раствор 1. 0,2 М Na_2HPO_4 (71,6 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, вода до 1000 мл)

Раствор 2. 0,1 М лимонная кислота (19,2 г, вода до 1000 мл)

Для получения 200 мл смешать растворы в следующих пропорциях:

pH 4,0 — 77,1 мл раствора 1 и 122,9 мл раствора 2

pH 4,2 — 82,8 мл раствора 1 и 117,2 мл раствора 2

pH 5,0 — 103,0 мл раствора 1 и 97,0 мл раствора 2

pH 5,4 — 111,5 мл раствора 1 и 88,6 мл раствора 2

pH 7,0 — 164,7 мл раствора 1 и 35,3 мл раствора 2

Таблица 1. Характеристика методов дифференциального окрашивания хромосом, часто используемых в цитогенетике человека

Буквенный код метода окраски хромосом*	Тип сегментации и способ выявления		Особенности микроскопии
	Расшифровка кода	Комментарии	
QFQ	Q-bands by Fluorescence using Quinacrine	Q-сегментация, выявленная при окрашивании акрихином и его производными (акрихин-ипритом, акрихин-пропилом и др.)	Спектральные характеристики фильтров для анализа флуоресценции (нм): 400–440/500–700
QFH	Q-bands by Fluorescence using Hoechst 33258	Q-подобная сегментация. В редких случаях яркие сегменты обозначают как H-сегменты. Отличие от традиционного Q-рисунка, получаемого при окраске акрихином — яркая флуоресценция районов 1qh, 9qh, 15cenh, 16qh, 22cenh	Ультрафиолетовый фильтр для анализа флуоресценции. Спектральные характеристики фильтров (нм) 340–370/425–500 (оптимальные 359/461)
QFH/ACd	Q-bands by Fluorescence using Hoechst 33258 counterstained by Actinomycin D	Модифицированный QFH-рисунок. Совместное использование лигандов, аффинных к AT-парам оснований ДНК (Hoechst 33258) и CG-парам (актиномицин D) приводит к усилению контраста между Q-позитивными и Q-негативными сегментами	Ультрафиолетовый фильтр для анализа флуоресценции. Спектральные характеристики фильтров (нм) 340–370/425–500 (оптимальные 359/461)
QFH/MG	Modified Q-bands by Fluorescence using Hoechst 33258 counterstained by methyl green	Модифицированный QFH-рисунок со слабым контрастом между Q-позитивными и Q-негативными сегментами и ярко флуоресцирующими районами 1qh, 9qh, 15cenh, 16qh, 22cenh	Ультрафиолетовый фильтр для анализа флуоресценции. Спектральные характеристики фильтров (нм) 340–370/425–500 (оптимальные 359/461)
DAPI	Q-like bands by Fluorescence using DAPI	Q-подобный рисунок, аналогичный QFH	Ультрафиолетовый фильтр для анализа флуоресценции. Спектральные характеристики фильтров (нм) 340–370/425–500 (оптимальные 359/461)
DA/DAPI	Modified Q-bands by Fluorescence using DAPI counterstained by Distamycin A	Модифицированный QFH-рисунок со слабым контрастом между Q-позитивными и Q-негативными сегментами и ярко флуоресцирующими районами 1qh, 9qh, 15cenh, 16qh, 22cenh	Ультрафиолетовый фильтр для анализа флуоресценции. Спектральные характеристики фильтров (нм) 340–370/425–500 (оптимальные 359/461)

Таблица 1. (окончание)

Буквенный код метода окраски хромосом*	Тип сегментации и способ выявления		Особенности микроскопии
	Расшифровка кода	Комментарии	
GTG	G -bands by Trypsin using Giemsa	G-сегментация. Окрашивание красителем Гимза с предобработкой хромосом трипсином	Проходящий свет
CBG	C -bands by Barium hydroxide using Giemsa	C-сегменты, выявленные при окрашивании красителем Гимза с предобработкой в гидроксида бария	Проходящий свет
RBG	R -bands by BrdU using Giemsa	R-сегментация, полученная при окраске красителем Гимза после обработки хромосом 5'-бромдезоксисуридином (БДУ) (репликационная R-сегментация)	Проходящий свет
RBA	R -bands by BrdU using Acridine orange	R-сегментация, полученная при окраске акридиновым оранжевым после обработки хромосом 5'-бромдезоксисуридином (БДУ) (репликационная R-сегментация)	Спектральные характеристики фильтров для анализа флуоресценции (нм); 400–440/500–700
RHG	R -bands by Heating using Giemsa	R-сегментация, полученная при окраске красителем Гимза после термообработки	Проходящий свет
RFA	R -bands by Fluorescence using Acridine orange	R-сегментация, полученная при окраске акридиновым оранжевым	Спектральные характеристики фильтров (нм) для анализа флуоресценции: 400–440/500–700

* Трехбуквенные коды соответствуют Международной номенклатуре [510].

Таблица 2. Сокращения при описании хромосом и хромосомных аномалий [510]

AI	анафаза первого мейотического деления
AII	анафаза второго мейотического деления
ace	центрический фрагмент
add	дополнительный материал неизвестного происхождения
~	знак обозначения приблизительных интервалов и границ хромосомного сегмента
→ или →	знак обозначения интервала на хромосоме «от» и «до» в системе детального описания хромосомной перестройки
<>	знаки окружают цифры, обозначающие уровень пloidности
[]	квадратные скобки, в которых указывают число исследованных клеток с определенными характеристиками
c	конституциональная аномалия, т. е. отражающая хромосомную конституцию организма
cen	центромера
chi	химера
chr	хромосома
cht	хроматида
:	обозначает точки разрыва в системе детального описания хромосомной перестройки
:(знак «двоеточия»)	обозначает точки разрыва и воссоединения в системе детального описания хромосомной перестройки
::(двойное двоеточие)	обозначает точки разрыва и воссоединения в системе детального описания хромосомной перестройки
,	разделяет число хромосом, половые хромосомы и хромосомные аномалии
,(запятая)	разделяет число хромосом, половые хромосомы и хромосомные аномалии
.	знак отделения субсегмента
.(точка)	знак отделения субсегмента
cp	композитный кариотип (при характеристике кариотипа малигнизированных линий включает все численные и структурные аномалии)
cx	сложный хроматидный обмен
del	делеция
de novo	обозначает хромосомную аномалию, которая не была унаследована
der	производная хромосома
dia	диакинез
dic	дицентрик
dip	диплотена
dir	прямой порядок
dis	дистальный
dit	диктиотена
dmin	парные фрагменты (DM-хромосомы)
dup	дупликация
e	обмен
end	эндоредупликация
=	число хиазм
fem	женский пол
fis	расщепление в центромерном районе
fra	ломкий сайт
g	пробел
h	конститутивный гетерохроматин
hsr	гомогенно окрашивающийся район

Таблица 2 (продолжение)

i	изохромосома
idem	обозначение кариотипа стволовой линии в субклоне
ider	производная изохромосома
idic	изодицентрическая хромосома
inc	неполный кариотип
ins	инсерция
inv	инверсия
lep	лептотена
MI	метафаза первого мейотического деления
MII	метафаза второго мейотического деления
mal	мужской пол
mar	маркерная хромосома
mat	материнское происхождение хромосомы
med	средний
min	короткий ацентрический фрагмент
– (знак «минус»)	потеря
ml	основная линия
mn	модальное число
mos	мозаик
× (знак «умножения»)	множественные копии перестроенных хромосом
oom	метафаза оогония
or	альтернативная интерпретация
p	короткое плечо хромосомы
PI	профаза первого мейотического деления
pac	пахитена
()	выделение в круглых скобках aberrантных хромосом с указанием точек разрыва
pat	отцовское происхождение хромосомы
Ph	филадельфийская хромосома
pcc	преждевременная конденсация хромосом
pcd	преждевременное разделение центромер
+	используется для обозначения добавочной хромосомы или увеличения длины плеча хромосомы
pgx	проксимальный участок хромосомы
psu	псевдо-
pvz	пульверизация
? (знак вопроса)	сомнительная идентификация хромосомы или хромосомной структуры
q	длинное плечо хромосомы
qdp	квадрипликация
qg	квадрирадиальный
г	кольцевая хромосома
gcp	реципрокный (взаимный)
gea	хромосомная перестройка
rec	рекомбинантная хромосома
rob	Робертсоновская транслокация
I–IV (римские цифры)	обозначают унивалентные, бивалентные, тривалентные и тетравалентные структуры
s	обозначение спутников
sce	сестринский хроматидный обмен
sct	вторичная перетяжка
sdl	дополнительный клон в линии опухолевых клеток
sl	основной клон в линии опухолевых клеток

Таблица 2 (окончание)

;	знак разделения аберрантных хромосом с точками разрыва в межхромосомных перестройках
(точка с запятой)	
/	знак разделения клонов
(косая линия)	
stk	спутничная нить
t	транслокация
tas	теломерная ассоциация
tel	теломера
ter	терминальный
trc	трицентрическая хромосома
trp	трипликация
—	знак подчеркивания используется для отличия гомологичных хромосом
upd	однородительская дисомия
v	вариант или переменные районы
xma	хиазма
zug	зиготена

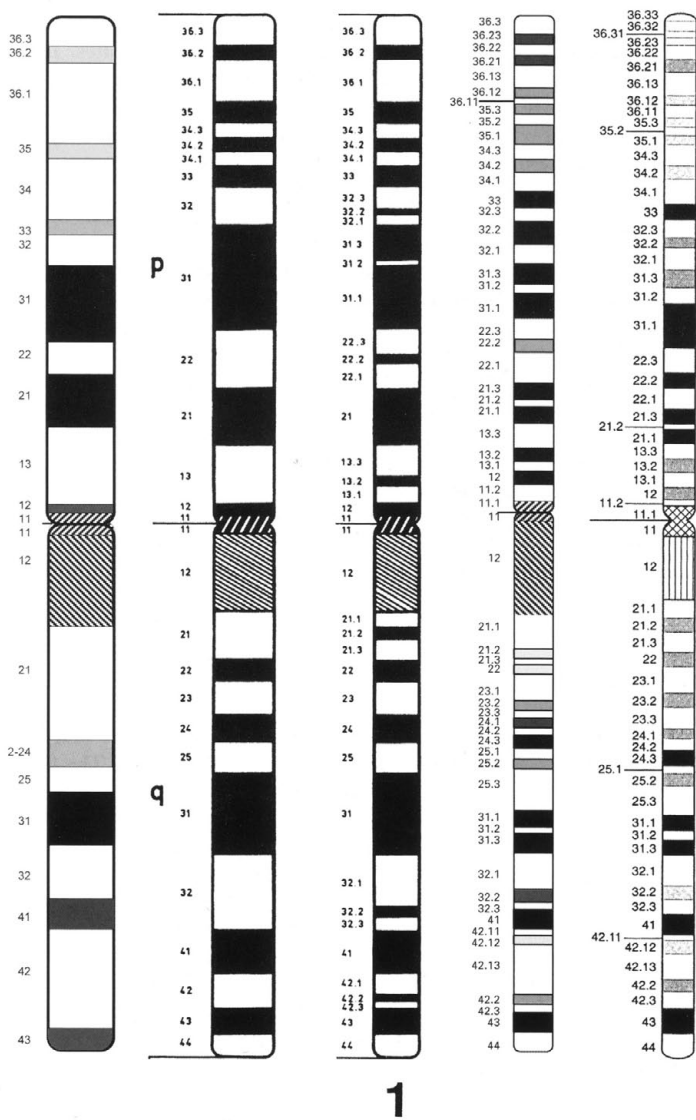
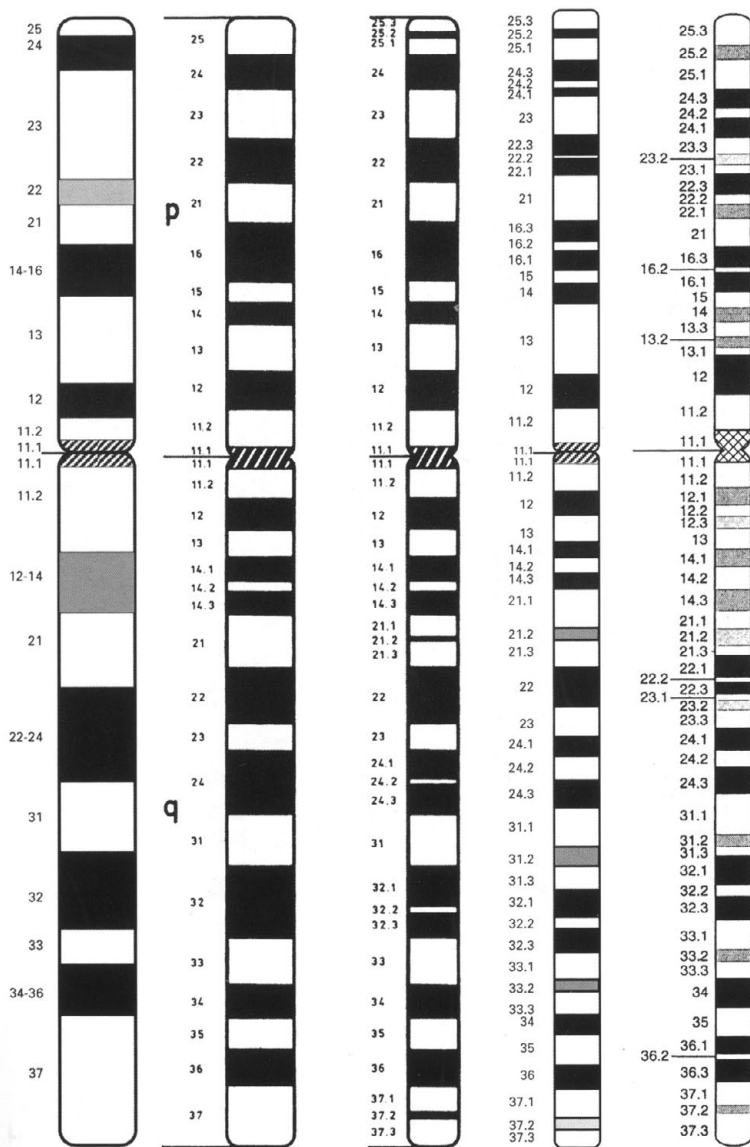


Рис. 1. Идиограммы G-сегментации хромосом человека для уровней разрешения – 300, 400, 550, 700 и 850 сегментов на гаплоидный геном [510]



2

Рис.1. (Продолжение)

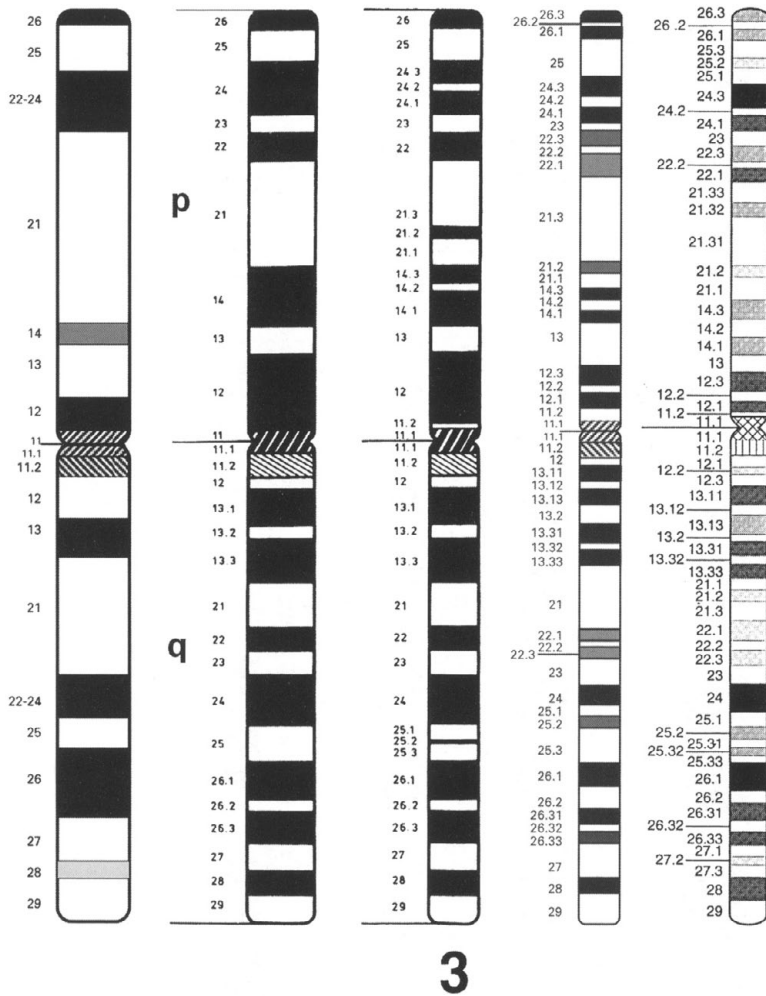
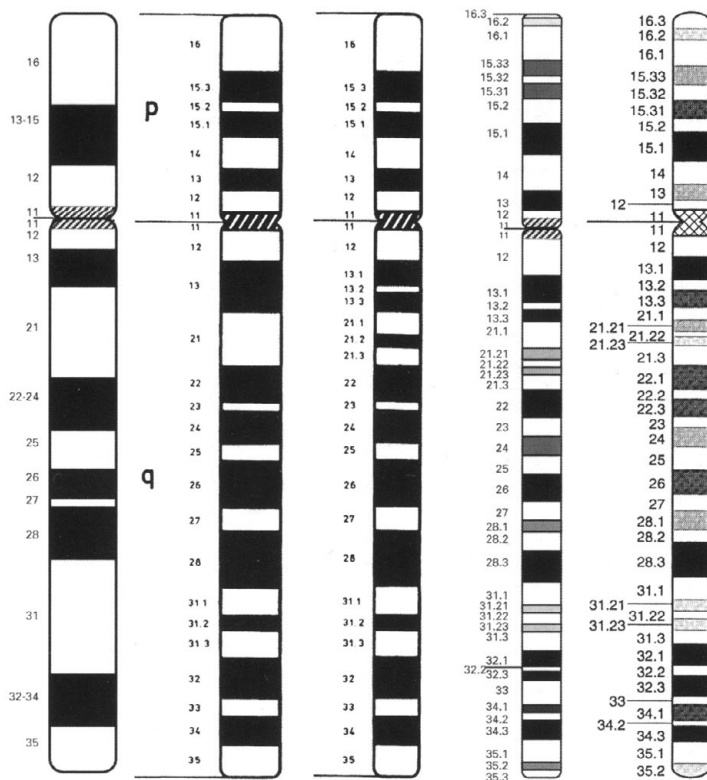


Рис.1. (Продолжение)



4

Рис.1. (Продолжение)

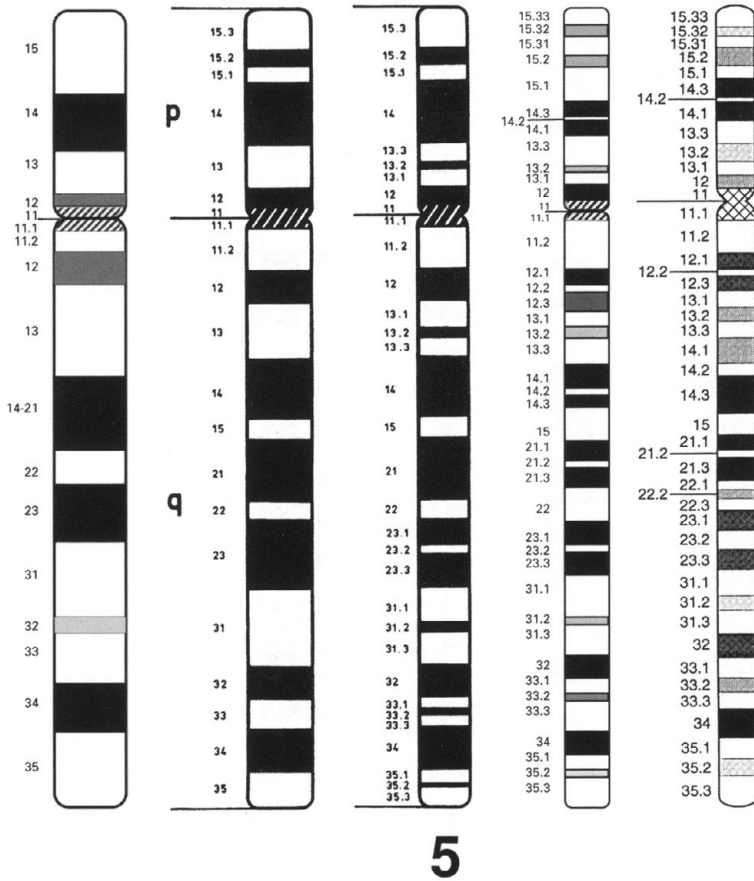
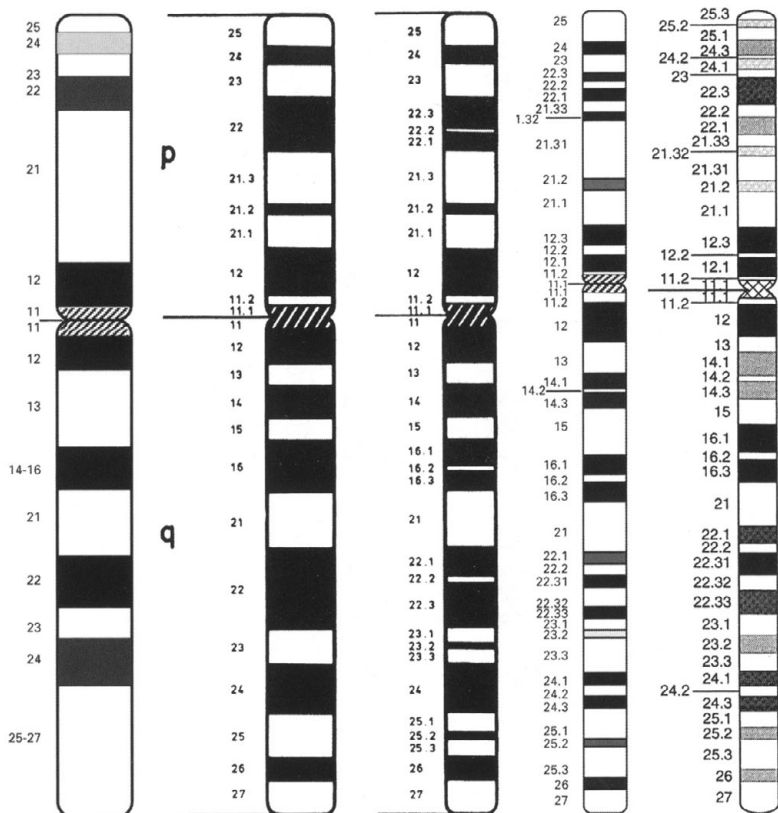


Рис.1. (Продолжение)



6

Рис.1. (Продолжение)

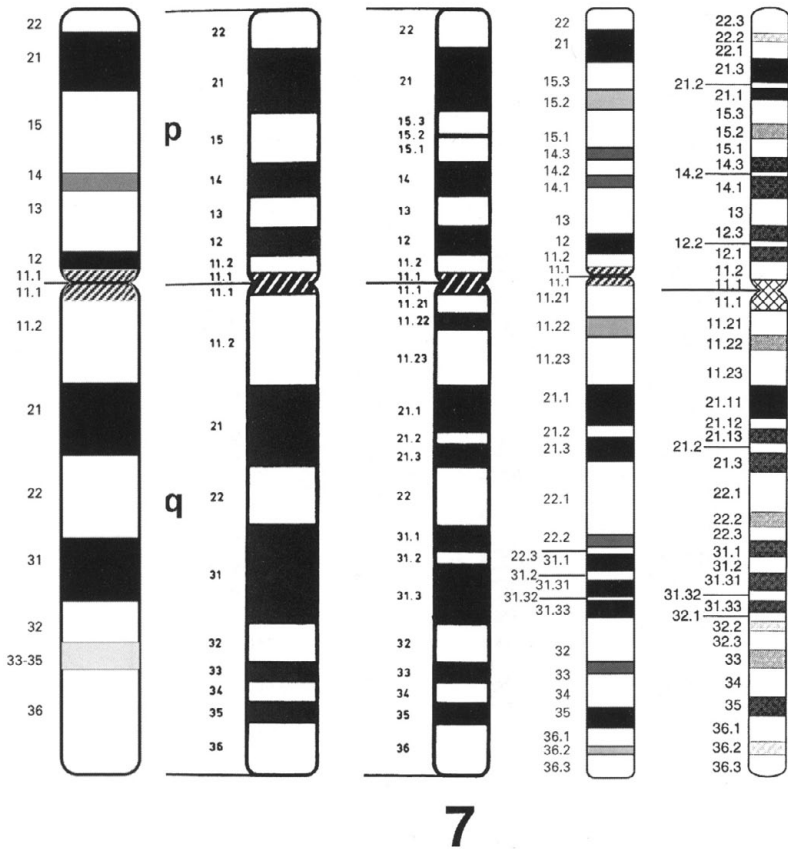


Рис.1. (Продолжение)

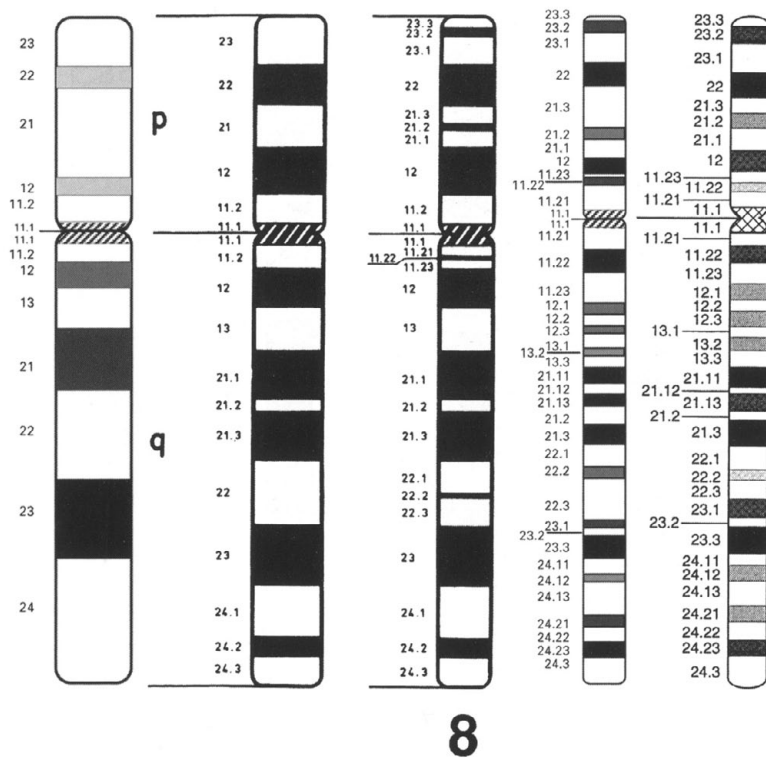


Рис.1. (Продолжение)

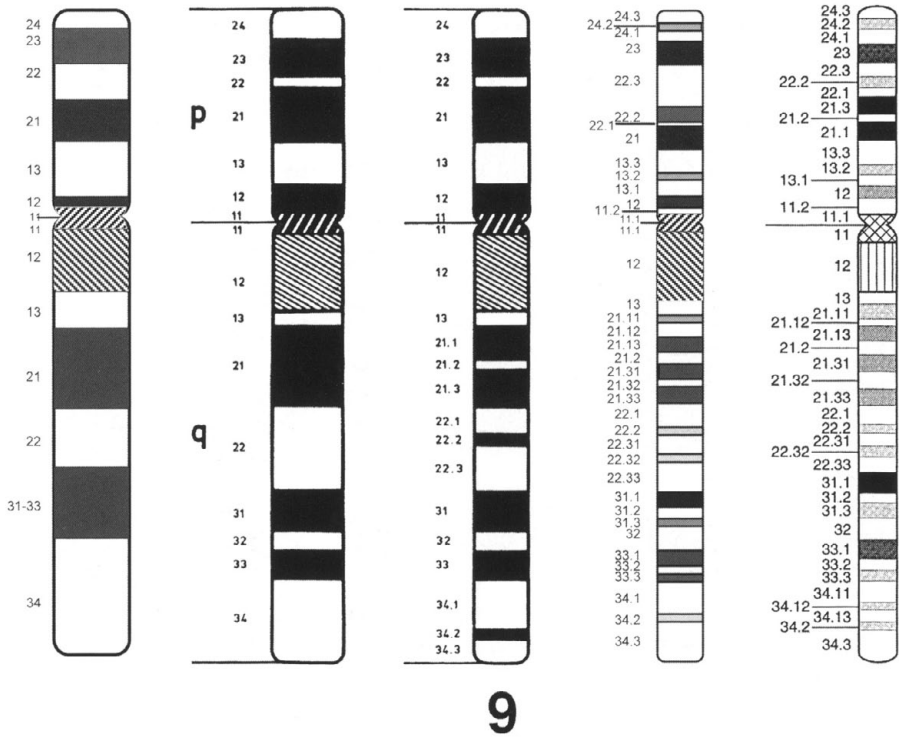


Рис.1. (Продолжение)

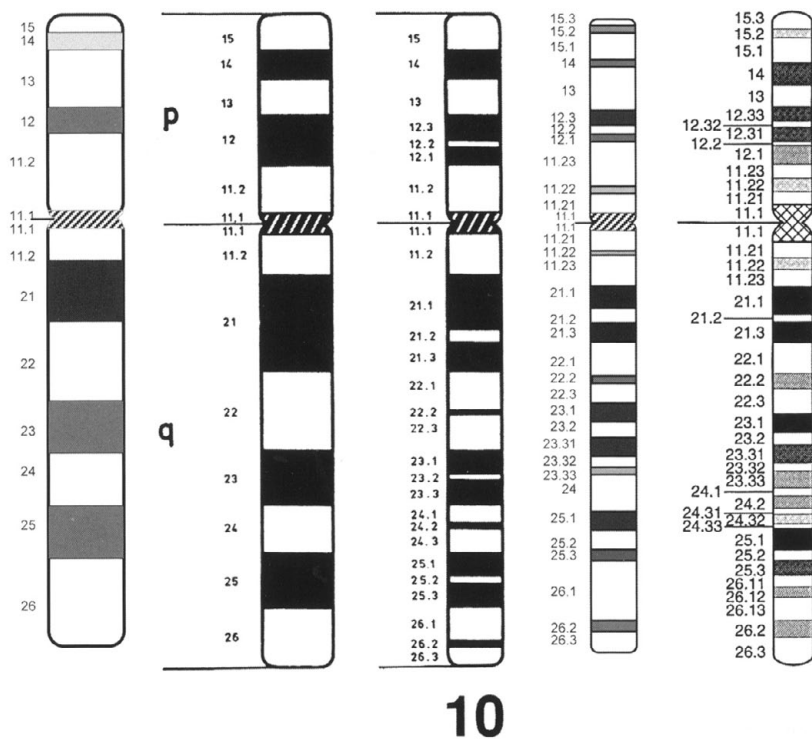


Рис.1. (Продолжение)

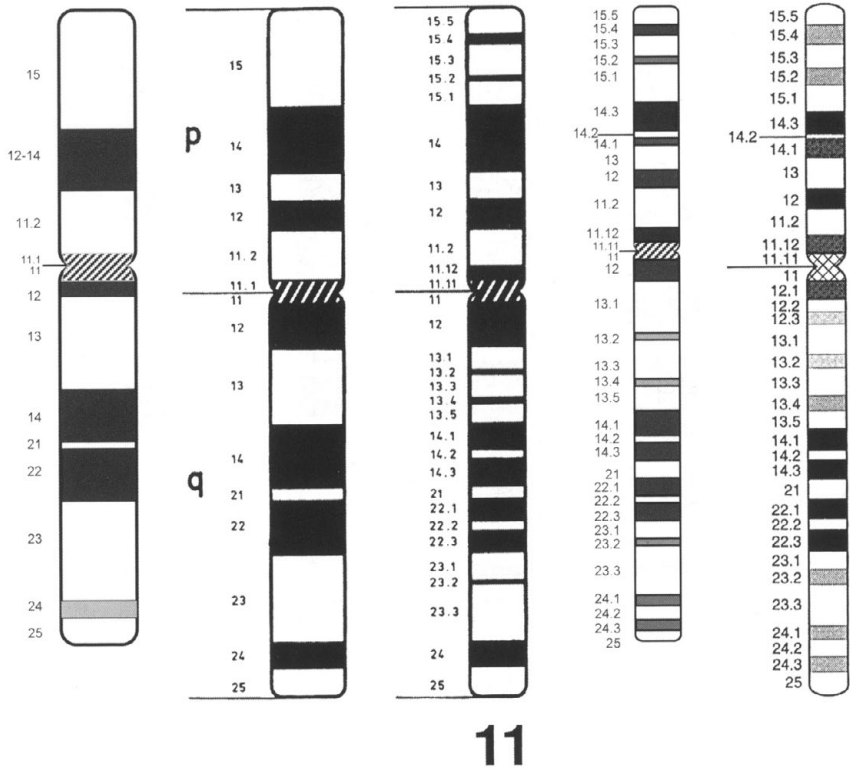
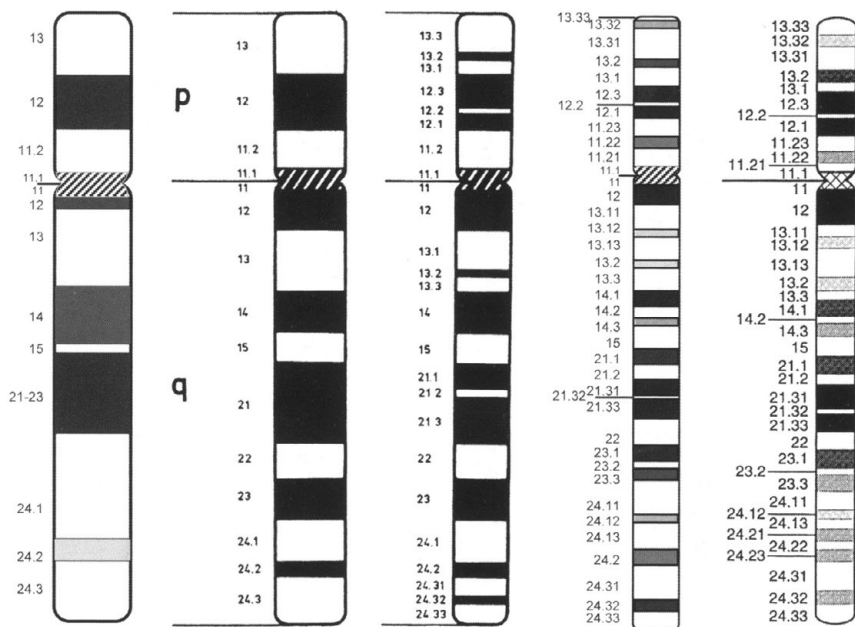
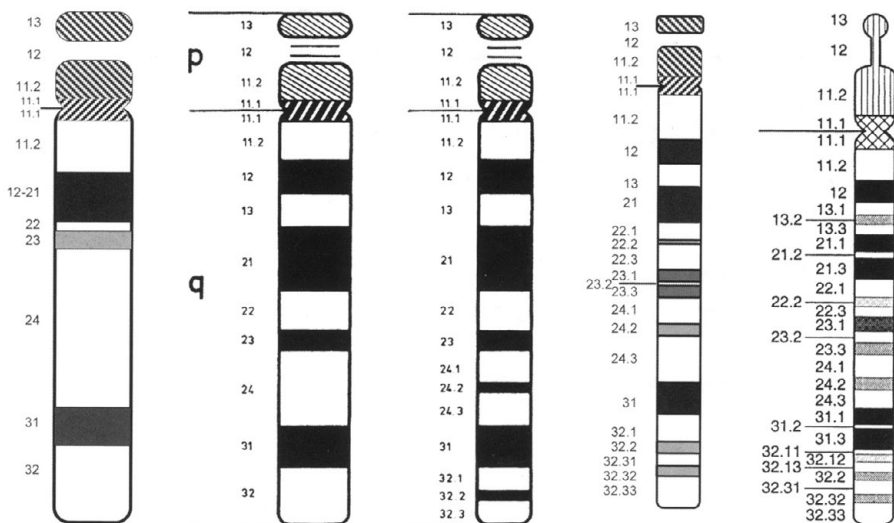


Рис.1. (Продолжение)

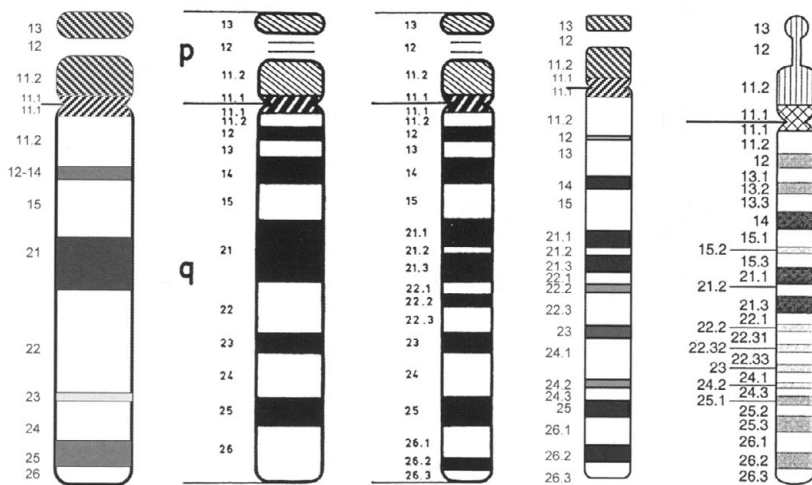


12

Рис.1. (Продолжение)



14



15

Рис.1. (Продолжение)

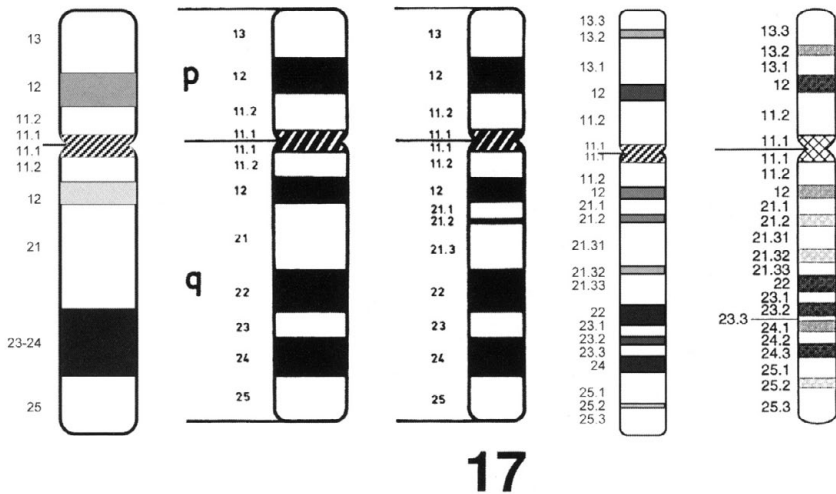
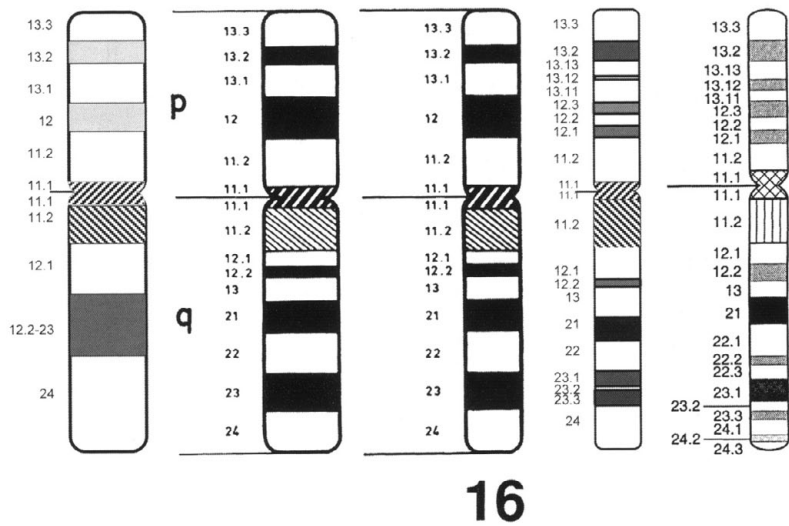
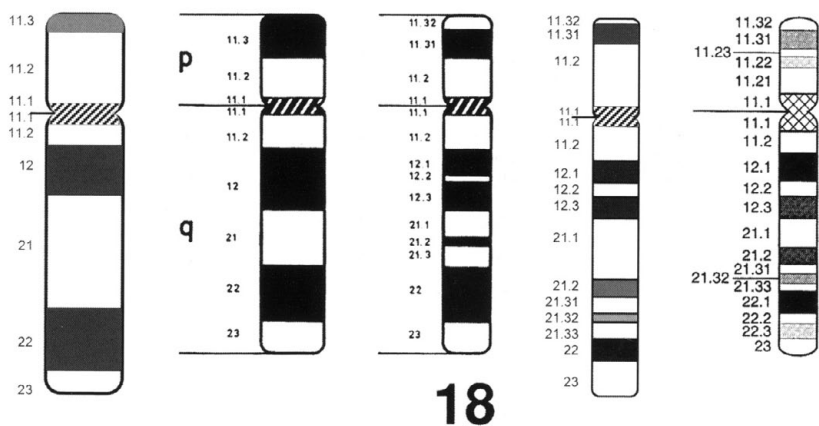
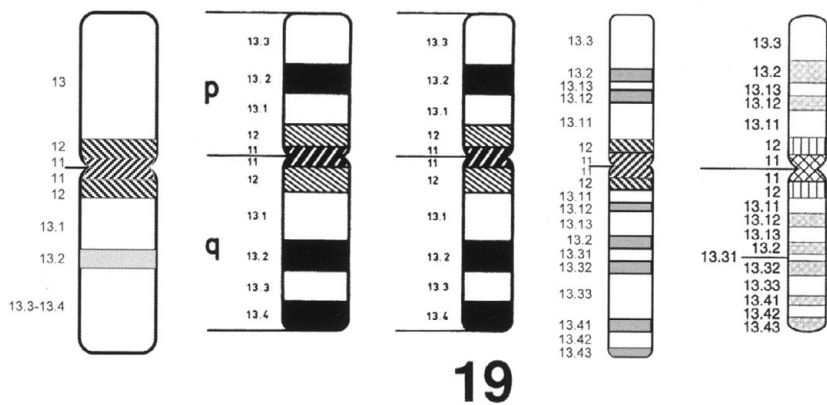


Рис.1. (Продолжение)



18



19

Рис.1. (Продолжение)

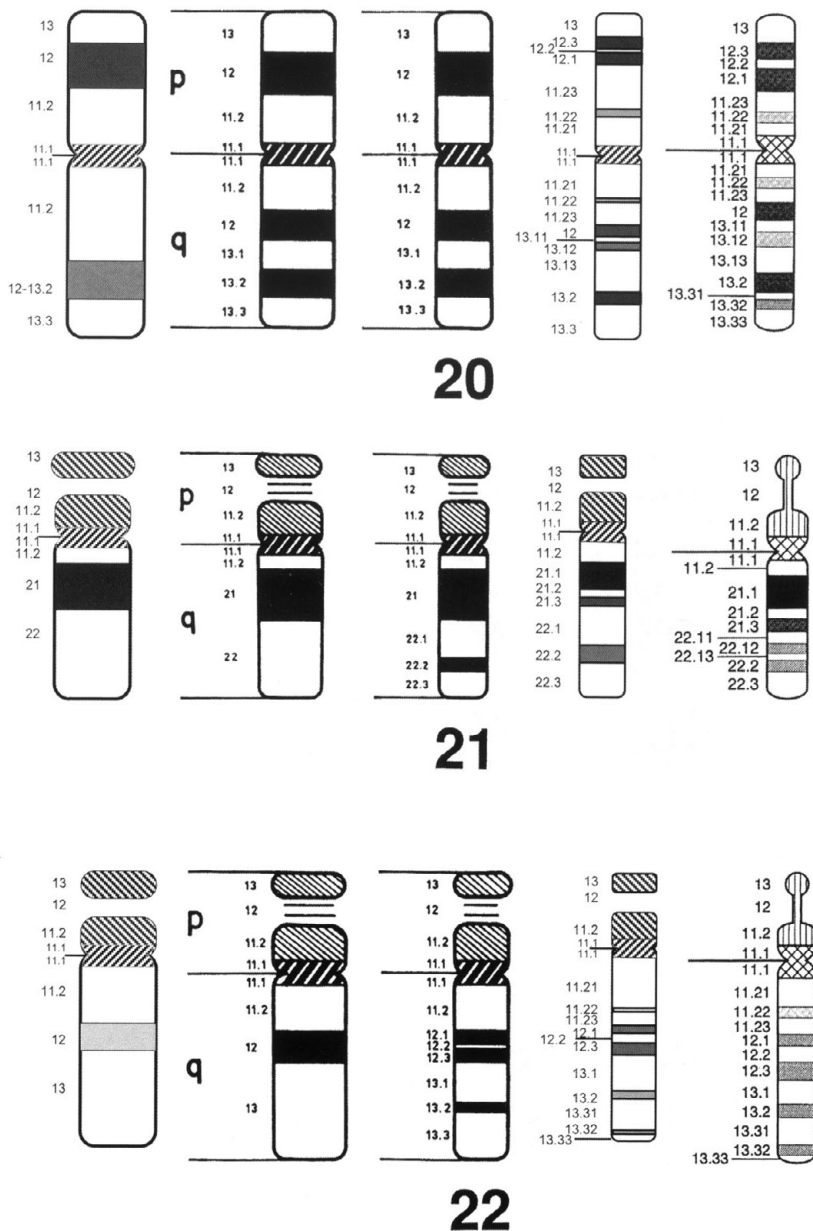


Рис.1. (Продолжение)

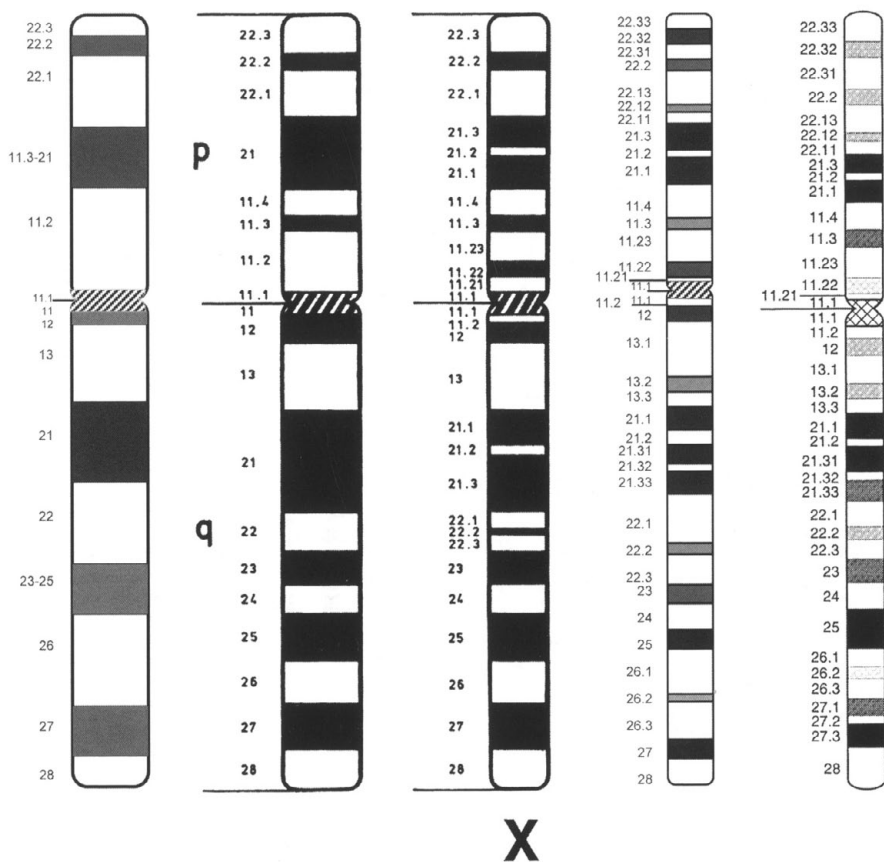


Рис.1. (Продолжение)

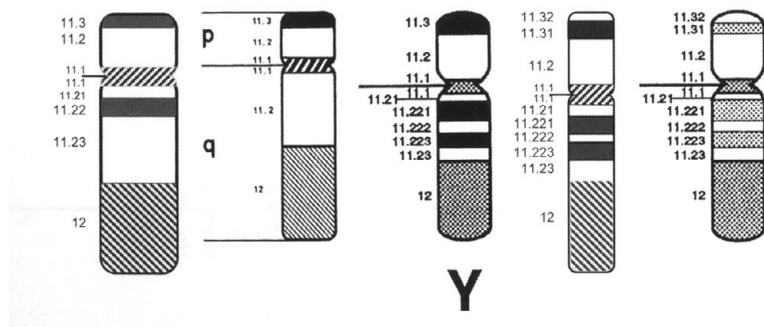


Рис.1. (Окончание)

Литература

1. *Айламазян Э.К.* Акушерство // Учебник для мед. вузов / Айламазян Э.К. — 5-е изд., доп. — СПб.: СпецЛит., 2005. — 527 с.
2. *Акопян Г.Ф.* Состояние районов С-гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 и Y в онтогенезе человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988. — 18 с.
3. Анализ распределения генов рибосомных РНК на хромосомах домашней лошади с помощью флуоресцентной in situ гибридизации / Дерюшева С.Е. [и др.] // Генетика. — 1997. — Т. 33, № 9. — С. 1281–1286.
4. Анализ частоты гетероплоидии в сперматозоидах человека при нарушении фертильности / Федорова И.Д. [и др.] // Генетика. — 2003. — Т. 9, № 3. — С. 427–432.
5. *Ауэрбах Ш.* Проблемы мутагенеза / Ауэрбах Ш. — М.: Мир, 1978. — 463 с.
6. *Баранов В.С.* Влияние моносомии некоторых аутосом на доимплантационное развитие лабораторных мышей / Баранов В.С. // Онтогенез. — 1983. — Т. 14, № 1. — С. 73–81.
7. *Баранов В.С.* Геном человека и гены «предрасположенности» // Введение в предиктивную медицину / Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. — СПб.: Интермедика, 2000. — 272 с.
8. *Баранов В.С.* Геномика и молекулярная медицина / Баранов В.С. // Мол. биол. — 2004. — Т. 38, № 1. — С. 1–7.
9. *Баранов В.С.* Метод стряхивания-отпечатывания — простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хориона / Баранов В.С. // Цитология. — 1989. — Т. 31, № 2. — С. 251–253.
10. *Баранов В.С.* Молекулярная медицина — основа генной терапии / Баранов В.С. // Мол. биол. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 684–695.
11. *Баранов В.С.* Морфогенетический и цитогенетический анализ хромосомных эмбриопатий в экспериментах на мышах: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Л., 1976. — 32 с.
12. *Баранов В.С.* Научные и практические аспекты пренатальной диагностики / Баранов В.С. // Вестн. Рос. АМН. — 2003. — № 10. — С. 8–13.
13. *Баранов В.С.* Особенности организации, основные итоги и перспективы пренатальной диагностики хромосомных болезней в Санкт-Петербурге / Баранов В.С., Кузнецова Т.В. // Принципы организации и методические основы профилактики инвалидизирующих наследственных болезней: сборник материалов республиканского совещания, 24–26 апреля 1996 г. — М., 1996. — С. 13–18.
14. *Баранов В.С.* Пренатальная диагностика / Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Иващенко Т.Э., Кашеева Т.К. // Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. — СПб.: Интермедика, 1997. — С. 203–227.
15. *Баранов В.С.* Пренатальная диагностика наследственных болезней. Современное состояние, реальность и перспективы / Баранов В.С. // Вестн. Рос. АМН. — 1987. — № 4. — С. 44–50.
16. *Баранов В.С.* Пренатальная диагностика хромосомных болезней плода // Методические рекомендации / Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Швед Н.Ю., Баранов А.Н. — СПб., 1995. — 21 с.
17. *Баранов В.С.* Ранняя диагностика наследственных болезней в России. Современное состояние и перспективы / Баранов В.С. // Межд. мед. обз. — 1994. — Т. 2, № 4. — С. 236–243.
18. *Баранов В.С.* Роль различных частей хромосомы 17 в раннем эмбриогенезе лабораторных мышей / Баранов В.С. // Генетика. — 1983. — Т. 19, № 2. — С. 246–254.
19. *Баранов В.С.* Хромосомный импринтинг и наследственные болезни / Баранов В.С. // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7, № 2. — С. 73–79.

20. Баранов В.С. Хромосомный импринтинг и хромосомные взаимодействия в раннем развитии млекопитающих / Баранов В.С. // Успехи современной биологии. — 1988. — Т. 105, № 3. — С. 393–405.
21. Баранов В.С. Хромосомный контроль раннего эмбрионального развития млекопитающих / Баранов В.С. // Онтогенез. — 1983. — Т. 14, № 6. — С. 573–578.
22. Барановская Л.И. Роль метилирования ДНК в репрессии активности рибосомных генов / Барановская Л.И. // Хромосомы человека в норме и патологии. — М.: Наука, 1989. — С. 21–25.
23. Барков И.Ю. Пренатальное определение пола (обзор литературы) / Барков И.Ю., Бахарев В.А., Каретникова Н.А. // Пробл. репрод. — 1999. — Т. 5, № 1. — С. 5–14.
24. Барцева О.Б. Эффективность пренатальной цитогенетической диагностики в I и II триместрах беременности: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1989. — 21 с.
25. Бахарев В.А. Пренатальная диагностика хромосомных болезней / Бахарев В.А., Доронина О.А., Каретникова Н.А. // Принципы организации и методические основы профилактики инвалидирующих наследственных болезней: сборник материалов республиканского совещания, 24–26 апреля 1996 г. — М., 1996. — С. 19–22.
26. Бодемар Ч. Современная эмбриология / Бодемар Ч. — М.: Мир, 1971. — 446 с.
27. Босток К. Хромосома эукариотической клетки // Пер. с англ. / Босток К., Самнер Э. / Под ред. А.Ф. Захарова. — М.: Мир, 1981. — 596 с.
28. Бочков Н.П. Генетика человека // наследственность и патология / Бочков Н.П. — М.: Медицина, 1978. — 377 с.
29. Бочков Н.П. Генетические технологии в педиатрии / Бочков Н.П. // Педиатрия. — 1995. — № 4. — С. 21–26.
30. Бочков Н.П. Генетический мониторинг популяций человека при реальных химических и радиационных нагрузках / Бочков Н.П., Катосова Л.Д. // Вестн. Рос. АМН. — 1992. — № 4. — С. 10–14.
31. Бочков Н.П. Клиническая генетика // Учебник / Бочков Н.П. — 3-е изд., испр. и доп. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 480 с.
32. Бочков Н.П. Наследственность человека и мутагены внешней среды / Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. — М. Медицина, 1989. — 272 с.
33. Брусиловский А.И. Функциональная морфология плацентарного барьера человека / Брусиловский А.И. — Киев: Здоровье, 1976. — 129 с.
34. Быстрое карiotипирование клеток млекопитающих / Рубцов Н.В. [и др.] // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 1. — С. 66–71.
35. Вахтин Ю.Б. Генетика соматических клеток / Вахтин Ю.Б. — Л.: Наука, 1974. — 258 с.
36. Воробьева О.А. Анализ частоты хромосомных aberrаций в ооцитах человека / Воробьева О.А., Кузнецова Т.В., Богомолова М.В., Баранов В.С. // Пробл. репрод. — 1997. — № 2. — С. 21–26.
37. Воробьева О.А. Влияние возраста на частоту гетероплоидии в ооцитах человека / Воробьева О.А., Богомолова М.В., Кузнецова Т.В., Козлов В.В. // Цитология. — 2000. — Т. 42, № 12. — С. 1179–1184.
38. Ворсанова С.Г. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура / Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. — Ростов-на-Дону: РГМУ, 1999. — 192 с.
39. Воскобойник Н.И. Активность рибосомных генов в трех возрастных группах, выявляемая на хромосомах, окрашенных серебром / Воскобойник Н.И., Василюк Л.В., Барс Я.В. // Хромосомы человека в норме и патологии. — М.: Наука, 1989. — 156 с.
40. Врожденные пороки развития: пренатальная диагностика и тактика / Под ред. Б.М. Петриковского, М.В. Медведев, Е.В. Юдина — М.: РАВУЗДП, Реальное время, 1999. — 256 с.
41. Генные сети / Колчанов Н.А. [и др.] // Мол. биол. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 533–544.

42. Гинтер Е.К. Медицинская генетика / Гинтер Е.К. — М.: Медицина, 2003. — 445 с.
43. Голубовский М.Д. 2000 — Век генетики: эволюция идей и понятий / Голубовский М.Д. — СПб.: Борей Арт, 2000. — 262 с.
44. Горбунова В.Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / Горбунова В.Н., Баранов В.С. — СПб.: СпецЛит, 1997. — 286 с.
45. Гречанина Е.Я. Пренатальное исследование и профилактика структурных аномалий плода: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1990. — 43 с.
46. Гринберг К.Н. Клеточная генетика в изучении наследственных болезней / Гринберг К.Н. // Вестн. АМН СССР. — 1982. — № 6. — С. 76–81.
47. Гринберг К.Н. Цитологические проявления хромосомного дисбаланса / Гринберг К.Н. // Прогресс в медицинской генетике / Под ред. Н.П. Бочкова. — М.: Медицина, 1978. — С. 151–186.
48. Давиденкова Е.Ф. Клинические синдромы при аномалиях половых хромосом / Давиденкова Е.Ф., Верлинская Д.К., Тысячнюк С.Ф. — Л.: Медицина, 1973. — 198 с.
49. Данилов Р.К. Общая и медицинская эмбриология / Данилов Р.К., Боровая Т.Г. — СПб.: СпецЛит, 2003. — 231 с.
50. Дисомия хромосом в половых клетках мужчин при нарушении сперматогенеза / Шаронин В.О. [и др.] // Probl. репрод. — 1999. — № 1. — С. 50–53.
51. Дыбан А.П. Механизм тератогенного действия фармакологических веществ и охрана здоровья в антенатальный период жизни / Дыбан А.П. // Вестн. АМН СССР. — 1966. — № 6. — С. 34–43.
52. Дыбан А.П. Оогенез млекопитающих / Дыбан А.П., Баранов В.С. // Современные проблемы оогенеза. — М.: Наука, 1977. — С. 200–239.
53. Дыбан А.П. Очерки патологической эмбриологии человека / Дыбан А.П. — Л.: Медгиз, 1959. — 327 с.
54. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих / Дыбан А.П. — Л.: Наука, 1988. — 228 с.
55. Дыбан А.П. Цитогенетика раннего развития млекопитающих / Дыбан А.П. // Институт экспериментальной медицины на рубеже тысячелетий. Достижения в области экспериментальной биологии и медицины. — СПб.: Наука, 2000. — С. 228–245.
56. Дыбан А.П. Цитогенетика эмбрионального развития млекопитающих / Дыбан А.П., Баранов В.С. — М.: Наука, 1978. — 216 с.
57. Дыбан А.П. Цитогенетический анализ сестринских наборов хромосом во втором полярном тельце и в пронуклеусах одноклеточных зародышей мышей. I. Частота и происхождение анеуплоидий у зародышей, гетерозиготных по реципрокной хромосомной транслокации T[14;15]6Ca1 / Дыбан А.П., Нониашвили Е.М., Фрейдин М.И. // Онтогенез. — 1998. — Т. 29, № 2. — С. 113–122.
58. Дыбан А.П. Ядрышкообразующие районы метафазных хромосом в камбиальных клеточных популяциях плаценты мыши и крысы / Дыбан А.П., Северова Е.Л., Зыбина Т.Г., Зыбина Е.В. // Цитология. — 1991. — № 7. — С. 25–34.
59. Дыбан П.А. Исследование цитодифференцировок, гистогенеза и органогенеза в экспериментальных тератомах: дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 2000. — 205 с.
60. Евдокимова В.Н. Отсутствие однопородительского наследования X-хромосом у спонтанных абортусов с 46,XX-кариотипом / Евдокимова В.Н., Назаренко С.А. // Онтогенез. — 2000. — Т. 31., № 3. — С. 201–204.
61. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / Жимулев И.Ф. — Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та, 2002. — 458 с.
62. Залетаев Д.В. Система генетических и эпигенетических маркеров в ДНК-диагностике злокачественных новообразований / Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бабанко О.В. // Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А. Пальцева. — М.: Медицина, 2004. — С. 35–93.

63. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бочков Н.П. // Вестн. Рос. АМН. — 2002. — № 4. — С. 6–11.
64. Захаров А.Ф. Хромосомы человека (Атлас) // Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. — М.: Медицина, 1982. — 264 с.
65. Золотницкая Р.П. Методы гематологического исследования / Золотницкая Р.П. // Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Миньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 106–148.
66. Золотухина Т.В. Клетки плода в крови матери: новый неинвазивный метод в пренатальной диагностике наследственных болезней / Золотухина Т.В., Шилова Н.В. // Вестн. Рос. АМН. — 1999. — № 12. — С. 45–48.
67. Золотухина Т.В. Методы пренатальной цитогенетической диагностики / Золотухина Т.В., Кухаренко В.И. // Итоги науки и техники. — 1990. — Т. 7. — С. 67–118.
68. Зыбина Т.Г. Умножение генома клеток вневорсиночного трофобласта в плаценте человека в ходе дифференцировки и инвазии в эндометрий и миометрий. II. Механизмы полиплоидизации / Зыбина Т.Г., Франк Х.-Г., Бистерфельд Ш., Кауфман П. // Цитология. — 2004. — Т. 46, № 7. — С. 640–648.
69. Иващенко Т.Э. Молекулярно-биологические методы исследований в клинической и лабораторной практике / Иващенко Т.Э., Асеев М.В., Баранов В.С. // Медицинские лабораторные технологии и диагностика. Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. — СПб.: Интермедика, 1999. — Т. 2. — С. 579–599.
70. Игнатъева Е.Л. Гонадотоксическое действие окситетрациклина на ранний антенатальный оогенез мышей в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / Игнатъева Е.Л., Курило Л.Ф. // Фармакол. токсикол. — 1984. — № 5. — С. 75–77.
71. Иммуноцитохимический анализ статуса метилирования метафазных хромосом человека / Пендина А.А. [и др.] // Цитология. — 2005. — Т. 47, № 8. — С. 731–737.
72. Инвазивные методы исследования в акушерской практике: итоги второго Российского мультицентрового исследования / Юдина Е.В. [и др.] // Пренат. диагн. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 91–96.
73. Исакова Г.К. Дифференциальная активность ядрышкообразующих районов хромосом в постимплантационном эмбриогенезе норки / Исакова Г.К., Жоголева Н.Н. // Онтогенез. — 1998. — Т. 29, № 1. — С. 57–65.
74. Казаков В.И. Основы медико-генетического консультирования / Казаков В.И., Ключева С.К., Прозорова М.В. — СПб.: ИД СПбМАПО, 2002. — 71 с.
75. Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену. В 2-х т. / Карлсон Б. // Пер. с англ.: — М.: Мир, 1983.
76. Кикнадзе И.И. Микроскопическая морфология мейоза и его модификаций / Кикнадзе И.И., Высоцкая Л.В. // Цитология и генетика мейоза / Под ред. В.В. Хвостовой, Ю.Ф. Богданова. — М.: Наука, 1975. — С. 15–41.
77. Кириллова И.А. Патологическая анатомия и патогенез пороков развития в пренатальном онтогенезе человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1994. — 42 с.
78. Киселев А.В. Генная терапия: состояние, проблемы, перспективы / Киселев А.В., Баранов А.Н., Баранов В.С. // Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А. Пальцева. — М.: Медицина, 2003. — С. 49–74.
79. Киселев Л.Л. Геном человека и биология XXI века / Киселев Л.Л. // Вестник Рос. АН. — 2000. — Т. 70, № 5. — С. 412–424.
80. Кнорре А.Г. Краткий очерк эмбриологии человека / Кнорре А.Г. — Л.: Медицина, 1967. — 268 с.
81. Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки) / Кнорре А.Г. — Л.: Медицина, 1971. — 429 с.
82. Коломиец О.Л. Повреждающее действие антибиотиков на структуру синаптонемных комплексов мейотических хромосом мыши / Коломиец О.Л. // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 2. — С. 197–206.

83. *Коломиец О.Л.* Синаптомный комплекс как индикатор хромосомной изменчивости: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1998. — 60 с.
84. *Корочкин Л.И.* Биология индивидуального развития / Корочкин Л.И. — М.: Изд-во МГУ, 2002. — 264 с.
85. *Корочкин Л.И.* Взаимодействие генов в развитии / Корочкин Л.И. — М.: Наука, 1975. — 220 с.
86. *Красникова О.В.* Изучение профазы мейоза в оогенезе у спонтанно абортированных плодов человека / Красникова О.В., Лапина Е.А., Кузнецова Т.В. // Невынашивание беременности и недоношенный ребенок: материалы научно-практич. конф., 17–19 июня 2001 г. — Петрозаводск, 2001. — С. 61.
87. *Кузнецов М.И.* Опыт использования кордоцентеза в целях пренатальной диагностики / Кузнецов М.И., Золотухина Т.В., Матвеева Е.В. // Педиатрия. — 1994. — № 2. — С. 93–95.
88. *Кузнецова Т.В.* Комплексный подход к цитогенетике эмбрионального развития человека: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб., 2000. — 38 с.
89. *Кузнецова Т.В.* Мейотические хромосомы эякулированных сперматозоидов быков / Кузнецова Т.В., Родионов А.В., Яковлев А.Ф. // Цитология. — 1990. — Т. 32, № 2. — С. 181–187.
90. *Кузнецова Т.В.* Ограниченный плацентарный мозаицизм: биологические и медицинские аспекты / Кузнецова Т.В., Гагарина А.В., Баранов В.С. // Пренат. диагн. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 141–153.
91. *Кулаженко В.П.* Морфологические и цитогенетические нарушения при спонтанных абортах у человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1975. — 68 с.
92. *Кулешов Н.П.* Современные методы в клинической цитогенетике / Кулешов Н.П. // Современные проблемы в клинической цитогенетике: учебно-методическое пособие / Под ред. Н.П. Кулешова. — М.: Наука, 1991. — С. 91–146.
93. *Кулиев А.М.* Фенотипические аспекты хромосомных эмбриолеталей человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1976. — 48 с.
94. *Курило Л.Ф.* Динамика преобразования хромосом в профазе мейоза в оогенезе человека / Курило Л.Ф. // Цитология. — 1980. — Т. 22, № 1. — С. 154–160.
95. *Курило Л.Ф.* Кариологический анализ состава незрелых половых клеток эякулята / Курило Л.Ф., Любашевская И.А., Дубинская В.П., Гаева Т.Н. // Урол. нефрол. — 1993. — № 2. — С. 45–47.
96. *Кухаренко В.И.* Клеточные и биохимические аспекты эмбриопатий человека с аномальным набором хромосом: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1995. — 47 с.
97. *Лазюк Г.И.* Наследственные синдромы множественных врожденных пороков развития / Лазюк Г.И., Лурье И.В., Черстой Е.Д. — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
98. *Лапина Е.А.* Влияние импульсных ультразвуковых волн на хронологию профазы мейоза у крысы / Лапина Е.А., Красникова О.В., Кузнецова Т.В. // Цитология. — 2002. — Т. 44, № 9. — С. 886.
99. *Лапина Е.А.* Особенности пролиферации цитотрофобласта ворсинчатого хориона плаценты человека / Лапина Е.А., Кузнецова Т.В. // II съезд ВОГиС: тезисы докладов, 1–5 февраля 2000 г. — СПб., 2000. — С. 240.
100. *Лебедев И.Н.* Особенности фенотипической экспрессии аутосомных моносомий при патологии постимплантационного развития человека / Лебедев И.Н., Назаренко С.А. // Онтогенез. — 2004. — Т. 35, № 1. — С. 53–60.
101. *Ляпунова Н.А.* Закономерности наследования полиморфных вариантов ядрышкообразующих хромосом человека / Ляпунова Н.А., Еголина Н.А., Викторов В.В. // Хромосомы человека в норме и патологии. — М.: Наука, 1989. — С. 12–20.
102. *Ляпунова Н.А.* Рибосомные гены в геноме человека: структурно-функциональная организация, фенотипическое проявление, связь с патологией / Ляпунова Н.А., Вейко Н.Н. // Материалы III съезда ВОГиС, 6–12 июня 2004 г. — М., 2004. — Т. 2. — С. 12.

103. *Ляпунова Н.А.* Цитогенетика ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом человека: выделение четырех морфофункциональных вариантов ЯОР, их межиндивидуальное и межхромосомное распределение / Ляпунова Н.А., Кравец-Мандрон И.А., Цветкова Т.Г. // Генетика. — 1998. — Т. 29, № 9. — С. 1298–1306.

104. *Мамаева С.Е.* Структура и функция ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты / Мамаева С.Е., Мамаев Н.Н. // Цитология. — 1992. — Т. 34, № 10. — С. 3–12.

105. *Машкова М.В.* Нарушения полового и физического развития у женщин, обусловленные мозаицизмом половых хромосом (варианты синдрома Шерешевского-Тернера): дис. ... канд. мед. наук. — Л., 1974. — 160 с.

106. *Медведев М.В.* Допплерография в акушерстве / Медведев М.В. — М.: РАВУЗДПГ, Реальное время, 1999. — С. 20–44.

107. Межиндивидуальные и межклеточные различия суммарной активности рибосомных генов, выявляемых Ag-окраской ядрышкообразующих районов акроцентрических хромосом человека / Ляпунова Н.А. [и др.] // Генетика. — 1988. — Т. 26, № 7. — С. 282–1288.

108. Метилирование ДНК — универсальный механизм регуляции активности генов / Пендина А.А. [и др.] // Экол. генет. — 2004. — Т. 2. — Вып. 1. — С. 27–37.

109. Методы биологии развития. Экспериментально-эмбриологические, молекулярно-биологические и цитологические. — М.: Наука, 1974. — 620 с.

110. *Милованов А.П.* Патология системы мать-плацента-плод / Милованов А.П. — М.: Медицина, 1999. — 447 с.

111. *Мионов В.А.* Архитектоника сосудистого русла плодовой части зрелой плаценты человека / Мионов В.А., Исакова М.И., Перетятко Л.П. // Арх. анатом. гистол. эмбриол. — 1988. — № 3. — С. 39–45.

112. *Михайлов А.В.* Внутриматочные вмешательства под ультразвуковым контролем во время беременности / Михайлов А.В. // Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике. В 5-й т. / Под ред. В.В. Митькова, М.В. Медведова. — М.: Видар, 1996. — Т. 2. — С. 280–302.

113. Молекулярно-генетический анализ микроделеций Y-хромосомы у мужчин с тяжелыми нарушениями сперматогенеза / Логинова Ю.А. [и др.] // Мол. биол. — 2003. — Т. 37, № 1. — С. 74–80.

114. Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомного дисбаланса в клетках спонтанных абортусов человека с низкой пролиферативной активностью *in vitro* / Лебедев И.Н. [и др.] // Генетика. — 2003. — Т. 39, № 8. — С. 1111–1122.

115. Морфологическое исследование сердца у плодов с хромосомными болезнями, абортированными после пренатальной диагностики в I триместре беременности / Новикова И.В. [и др.] // Пренат. диагн. — 2004. — Т. 3, № 3 — С. 197–202.

116. Морфология ворсинчатого хориона с хромосомными аномалиями / Волощук И.Н. [и др.] // Медицинская генетика. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 38–41.

117. *Назаренко С.А.* Изменчивость хромосом и развитие человека / Назаренко С.А. — Томск: Томский ун-т, 1993. — 200 с.

118. *Назаренко С.А.* Интерфазный анализ X-анеуплоидии методом флюоресцентной гибридизации *in situ* в разных тканях здоровых лиц / Назаренко С.А., Тимошевский В.А., Островерхова Н.В. // Генетика. — 1997. — Т. 33, № 10. — С. 1426–1430.

119. *Назаренко С.А.* Межклеточные различия С-полиморфных районов хромосом у эмбрионов человека: возможная роль метилирования ДНК / Назаренко С.А., Карагеоргий Н.М. // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 11. — С. 1578–1581.

120. *Назаренко С.А.* Нарушение эпигенетической регуляции активности генов и болезни человека / Назаренко С.А. // Вестн. Рос. АМН. — 2001. — № 10. — С. 43–48.

121. *Назаренко С.А.* Однородительские дисомии и болезни геномного импринтинга / Назаренко С.А., Саженова Е.А. — Томск: Печатная мануфактура, 2004. — 37 с.

122. Назаренко С.А. Сравнительный анализ активности ядрышкообразующих районов хромосом у спонтанных и медицинских абортусов / Назаренко С.А., Карташева О.Г. // Генетика. — 1991. — Т. 27, № 6. — С. 1095–1103.

123. Назаренко С.А. Тест-система внешнего контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы // Пособ. для врачей / Назаренко С.А., Васильева Е.О. — Томск: Печатная мануфактура, 2003. — 34 с.

124. Назаренко С.А. Цитогенетика человека и хромосомные болезни / Назаренко С.А., Яковлева Ю.С. — Томск: SST, 2001. — 83 с.

125. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / Козлова С.И. [и др.]. — М.: Практика, 1996. — 416 с.

126. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития / Баранов В.С. [и др.] // Цитология. — 2005. — Т. 47, № 6. — С. 723–730.

127. Немцова М.В. Нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов как новый класс молекулярной патологии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2002. — 48 с.

128. Немцова М.В. Эпигенетические нарушения экспрессии гена и наследственная патология у человека / Немцова М.В., Залетаев Д.В. // Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А. Пальцева. — М.: Медицина, 2004. — С. 94–146.

129. Никитин А.И. Факторы регуляции дифференцировки соматических клеток фолликулов яичников млекопитающих / Никитин А.И., Воробьева О.А. // Цитология. — 1988. — Т. 30, № 10. — С. 1155–1171.

130. Новый подход к расчету риска при проведении скринингового ультразвукового исследования в первом триместре беременности / Некрасова Е.С. [и др.] // Пренат. диагн. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 22–28.

131. О генетической гетерогенности первичного гипогонадизма / Нагорная И.И. [и др.] // Педиатрия. — 1996. — № 5. — С. 101–103.

132. Определение генетической предрасположенности к некоторым мультифакториальным заболеваниям. Генетический паспорт: методические рекомендации / Под ред. В.С. Баранов, В.Х. Хавинсон — СПб.: ИФК Фолиант, 2001. — 48 с.

133. Основы пренатальной диагностики / Баранов В.С. [и др.] / Под ред. Е.В. Юдиной и М.В. Медведева. — М.: РАВУЗДПП, Реальное время, 2002. — 184 с.

134. Основы цитогенетики человека / Под ред. А.А. Прокофьева-Бельговская — М.: Медицина, 1969. — 544 с.

135. Особенности метилирования прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16 у эмбрионов человека / Пендина А.А. [и др.] // Цитология. — 2001. — Т. 43, № 8. — С. 772–776.

136. Особенности наследования структурно-функционального статуса ядрышкообразующих районов хромосом в клетках цитотрофобласта человека / Журина Д.И. [и др.] // Цитология. — 2002. — Т. 44, № 10. — С. 877.

137. Особенности репликации прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 в клетках хориона и эмбриональных тканей человека / Воробьева А.В. [и др.] // Цитология. — 2002. — Т. 44, № 9. — С. 868.

138. Особенности течения и исхода беременности при хромосомном мозаицизме, ограниченном плацентой / Гагарина А.В. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. — 2002. — Т. LI, Вып. 1. — С. 40–45.

139. Островерхова Н.В. Детекция анеуплоидии у спонтанных абортусов методом сравнительной геномной гибридизации / Островерхова Н.В., Назаренко С.А., Лебедев И.Н. // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 12. — С. 1690–1698.

140. Оценка активности ядрышковых организаторов опухолевых клеток у больных раком пищевода и желудка / Мамаев Н.Н. [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1985. — Т. 99, № 4. — С. 477–479.

141. Оценка сперматогенеза по незрелым половым клеткам эякулята / Курило Л.Ф. [и др.] // Пробл. репрод. — 1995. — № 3. — С. 33–38.
142. Павлов Ю.В. Здравоохранение Санкт-Петербурга в годы реформ: статистический обзор / Павлов Ю.В., Красильников И.Л. — СПб.: Человек, 1999. — 192 с.
143. Паткин Е.Л. Динамика структурно-функциональной организации метафазных и интерфазных хромосом в раннем эмбриогенезе млекопитающих в исследовании *in situ*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб., 1995. — 42 с.
144. Паткин Е.Л. Исследование структурного хроматина на начальных стадиях развития зародышей мышей / Паткин Е.Л. // Онтогенез. — 1980. — Т. 11, № 1. — С. 1343–1349.
145. Пендина А.А. Распределение ник-трансляционного сигнала на метафазных хромосомах эмбрионов человека / Пендина А.А., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. // Цитология. — 2000. — Т. 42, № 3. — С. 300–301.
146. Пендина А.А. Полиморфизм ядрышкообразующих районов хромосом у эмбрионов человека / Пендина А.А., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. // Цитология. — 2000. — Т. 42, № 6. — С. 594–599.
147. Перспективы медицинской генетики / Под ред. Н.П. Бочков — М.: Медицина, 1982. — 400 с.
148. Подугольникова О.А. Вариабельность размеров С-сегментов хромосом 1, 9, 16 и Y в хромосомном наборе человека / Подугольникова О.А., Сычева Ж.Л., Прокофьева-Бельговская А.А. // Цитология. — 1979. — Т. 21, № 6. — С. 667–669.
149. Получение и характеристика постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека / Крылова Т.А. [и др.] // Цитология. — 2003. — Т. 45, № 12. — С. 1172–1178.
150. Пособие для изучающих медицинскую и клиническую генетику / Лильин Е.Т. [и др.]. — М.: Изд-во ЛМС, 1996. — 120 с.
151. Пренатальная диагностика в акушерстве. Современное состояние, методы, перспективы // Методическое пособие / Баранов В.С. [и др.]. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2002. — 64 с.
152. Пренатальная диагностика врожденных пороков развития в ранние сроки беременности / Под ред. М.В. Медведев — М.: РАВУЗДПП, Реальное время, 2000. — 160 с.
153. Пренатальная диагностика врожденных пороков развития плода / Под ред. Р. Ромеро [и др.]. — М.: Медицина, 1994. — 448 с.
154. Пренатальная диагностика методом биопсии ворсин хориона при высоком риске прерывания беременности / Круговой А.А. [и др.] // Ультразвуковая перинатальная диагностика. — 1994. — № 4–5. — С. 50–57.
155. Пренатальная диагностика хромосомных болезней у плода: десятилетний опыт / Кузнецова Т.В. [и др.] // Вестн. Рос. Асс. акуш.-гин. — 1997. — № 3. — С. 94–99.
156. Применение реакции специфической амплификации в пренатальной диагностике пола плода и генотипировании индивидуальных клеток / Кашеева Т.К. [и др.] // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7, № 3. — С. 45–49.
157. Проблема хромосомного мозаицизма у пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера / Вяткина С.В. [и др.] // Медицинская генетика. — 2003. — № 3. — С. 18–25.
158. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом / Прокофьева-Бельговская А.А. — М.: Наука, 1986. — 411 с.
159. Пэттен Б. Эмбриология человека / Пэттен Б. — М.: Медицина, 1959. — 467 с.
160. Радзинский В.Е. Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности / Радзинский В.Е., Милованова А.П. — М.: МИА, 2004. — 393 с.
161. Родионов А.В. Генетическая активность ДНК G- и R-блоков митотических хромосом человека / Родионов А.В. // Генетика. — 1985. — Т. 21, № 12. — С. 2057–2065.
162. Родионов А.В. Принципы построения идеограмм / Родионов А.В. // Количест-

венный анализ результатов дифференциального окрашивания и радиоавтографов хромосом: методические рекомендации. — Л., 1981. — С. 6–9.

163. Родионов А.В. Эволюция дифференциальной исчерченности хромосом / Родионов А.В. // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 3. — С. 277–290.

164. Розовский В.С. Определение пола плода в первом триместре беременности / Розовский В.С., Казы З., Бахарев В.А. // Акуш. и гин. — 1980. — № 8. — С. 35–37.

165. Рубцов Н.Б. Анализ маркерных хромосом: ДНК пробы для оценки возможного клинического значения маркерных хромосом / Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А., Шкляева О.А. // Мед. генет. — 2003. — Т. 2, № 12. — С. 520–527.

166. Рубцов Н.Б. Системы идентификации гомологичных районов хромосом: сравнительная цитогенетика млекопитающих и хромосомные патологии человека: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Новосибирск, 1996. — 48 с.

167. Рубцов Н.Б. Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомной патологии / Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А. // Генетика — медицине. — М.: Академкнига, 2005. — С. 219–244.

168. Рубцов Н.Б. Хромосомы млекопитающих: методы цитогенетического анализа // Учебное пособие / Рубцов Н.Б. — Новосибирск: Изд-во Новосибирского гос. ун-та, 2004. — Ч. 1. — 108 с.

169. Сабанеева Е.В. Специфичность окрашивания ядрышковых организаторов азотнокислым серебром / Сабанеева Е.В. // Цитология. — 1989. — Т. 31, № 3. — С. 5–12.

170. Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез / Светлов П.Г. // Вопросы цитологии и общей физиологии. — М.: Изд-во АН СССР, 1960. — С. 263–285.

171. Северова Е.Л. Ядрышкообразующие районы хромосом и аргентофильные белки в раннем эмбриогенезе мышевидных грызунов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1990. — 18 с.

172. Семенова-Тянь-Шанская А.Г. Половой зачаток (гонобласт), его происхождение и эволюция / Семенова-Тянь-Шанская А.Г., Кнорре А.Г. // Арх. анат. гистол. эмбриол. — 1972. — Т. 8, № 1. — С. 29–40.

173. Серов В.Н. Руководство по практическому акушерству / Серов В.Н., Стрижаков А.Н., Маркин С.А. — М.: МИА, 1997. — 243 с.

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

175. Скворцова М.Н. Ультразвуковое исследование в ранние сроки беременности / Скворцова М.Н., Медведев М.В. // Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / Под ред. В.В. Митьков, М.В. Медведев — М.: Видар, 1996. — Т. 2. — С. 9–28.

176. Смарагдов М.Г. Исследование конденсации эу- и гетерохроматина в хромосомах дрозофилы, окрашенных флуорохромом Hoechst 33258 / Смарагдов М.Г., Смирнов А.Ф., Родионов А.В. // Цитология. — 1980. — Т. 14, № 3. — С. 37–42.

177. Смирнов В.Г. Цитогенетика / Смирнов В.Г. — М.: Высшая школа, 1991. — 247 с.

178. Снайдерс Р.Дж.М. Ультразвуковые маркеры хромосомных дефектов плода / Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х. — М.: Видар, 1997. — 192 с.

179. Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных стадиях их дифференцировки в биоптате яичка и эякуляте у пациентов с азоо- и олигозооспермией / Курило Л.Ф. [и др.] // Пробл. репрод. — 1997. — № 1. — С. 80–84.

180. Структурная стабильность ядрышкообразующих районов хромосом человека / Созанский О.А. [и др.] // Хромосомы человека в норме и патологии. — М.: Наука, 1989. — 156 с.

181. Тератология человека / Под ред. Г.И. Лазюк — М.: Медицина, 1991. — 315 с.

182. Увеличение частоты и риска рождения детей с болезнью Дауна в Ленинграде / Давиденкова Е.Ф. [и др.] // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 2. — С. 105–110.

183. Ультраструктура ядра ооцитов из полостных фолликулов человека. Форми-

рование кариосферы / Парфенов В.Н. [и др.] // Цитология. — 1984. — Т. 26, № 11. — С. 1343–1349.

184. Ускоренный прямой метод получения метафазных и прометафазных хромосом из клеток биоптата хориона и эмбрионов человека в первом триместре беременности / Баранов В.С. [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины — 1990. — Т. 110, № 8. — С. 196–198.

185. Федорова И.Д. Цитогенетическая характеристика эякулированных клеток сперматогенного ряда человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2004. — 16 с.

186. Федорова М.В. Плацента и ее роль при беременности / Федорова М.В., Калашникова Е.П. — М.: Медицина, 1986. — 252 с.

187. Фогель Ф. Генетика человека. В 3-х т. / Фогель Ф., Мотульски А. — М.: Мир, 1989.

188. Харченко Т.В. Цитогенетические аспекты невынашивания беременности и эмбриональных потерь при вспомогательных репродуктивных технологиях / Харченко Т.В., Ильин А.Б., Абашин В.Г. // Журнал акушерства и женских болезней — 2003. — Т. LI, Вып. 1. — С. 72–78.

189. Хвостова В.В. Перестройки хромосом в мейозе / Хвостова В.В., Ячевская Г.Л. // Цитология и генетика мейоза. — М.: Наука, 1975. — С. 232–262.

190. Хожай Л.Д. Изучение кариологии начального эмбриогенеза при оплодотворении и партеногенетическом развитии у мышей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1981. — 25 с.

191. Худoley В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия / Худoley В.В. — СПб.: НИИ химии СПбГУ, 1999. — 419 с.

192. Цитогенетические методы / Кузнецова Т.В. [и др.] // Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. — СПб: Интермедика, 1999. — Т. 2. — С. 550–578.

193. Цитогенетический анализ сперматозоидов человека с использованием внутрицитоплазматической инъекции в ооциты мыши / Федорова И.Д. [и др.] // Генетика. — 2005. — Т. 41, № 3. — С. 310–317.

194. Цитогенетическое исследование и микроделеционный анализ локусов AZF у пациентов с азооспермией и олигозооспермией неясного генеза перед проведением ИКСИ / Логинова Ю.А. [и др.] // Пробл. репрод. — 2000. — № 5. — С. 27–33.

195. Цитогенетическое исследование хориона человека с целью пренатальной диагностики наследственных болезней / Баранов В.С. [и др.] // Цитология. — 1990. — Т. 32, № 1. — С. 74–78.

196. Чагин В.О. Множественное замедление синтеза ДНК в течение S-фазы клеточного цикла: исследование методом проточной цитометрии / Чагин В.О., Розанов Ю.М., Томилин Н.В. // Докл. Академии наук. — 2004. — Т. 394. — С. 11–14.

197. Частота, диагностика, профилактика наследственных болезней и врожденных пороков развития в Санкт-Петербурге / Баранов В.С. [и др.]. — СПб.: Медицинская пресса, 2004. — 128 с.

198. Юров Ю. Альфа-сателлитная ДНК человека, специфичная к хромосомам 21 и 13: анализ полиморфизма акроцентрических хромосом и происхождение дополнительной хромосомы 21 при синдроме Дауна / Юров Ю., Селиванова Е., Дерягин Г. // Генетика. — 1991. — Т. 27, № 9. — С. 1637–1647.

199. Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом человека: опыт количественного цитологического и молекулярного анализа / Ляпунова Н.А. [и др.] // Биол. мембраны. — 2001. — Т. 18, № 3. — С. 189–199.

200. A 47,XXY fetus resulting from ICSI in man an elevated frequency of 24, XY spermatozoa / Moosani N. [et al.] // Hum. Reprod. — 1999. — Vol. 14, N 4. — P. 1137–1138.

201. A chromosome 13-specific human satellite I DNA subfamily with minor presence on chromosome 21: further studies on Robertsonian translocations / Kalitis P. [et al.] // Genomics. — 1993. — Vol. 16, N 1. — P. 104–112.

202. A clinical and cytogenetic study of Turner syndrome / Suri M. [et al.] // *Indian Pediatr.* — 1995. — Vol. 32, N 4. — P. 433–442.
203. A draft annotation and overview of the human genome / Wright F.A. [et al.] // *Genome Biol.* — 2001. — Vol. 2, N 7. — P. 0025.1–0025.18.
204. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif / Sinclair A.H. [et al.] // *Nature.* — 1990. — Vol. 346, N 6281. — P. 240–244.
205. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents / Templado C. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 59, N 4. — P. 345–348.
206. A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes / Navarro J. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1986. — Vol. 72, N 3. — P. 272–274.
207. A strategy for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (SMC) / Liechr T. [et al.] // *BJMG.* — 2003. — Vol. 6, N 3–4, Suppl. 1. — P. 69–72.
208. A Turner syndrome woman with a ring X chromosome whose child also had a ring X chromosome / Uehara S. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1997. — Vol. 67, N 3. — P. 576–579.
209. A Y-chromosome gene family with RNA — binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis / Ma K. [et al.] // *Cell.* — 1993. — Vol. 75, N 7. — P. 1287–1295.
210. *Abruzzo M.A.* Etiology of nondisjunction in humans / *Abruzzo M.A., Hassold T.J.* // *Envir. Mol. Mutagen.* — 1995. — Vol. 25, N 26. — P. 38–47.
211. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: an observational study / Cicero S., Curcio P., Papageorghiou A. [et al.] // *Lancet.* — 2001. — Vol. 358, N 9294. — P. 1665–1667.
212. Activation of an imprinted *Igf2* gene in mouse somatic cell cultures / Eversole-Cire P. [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* — 1993. — Vol. 13, N 8. — P. 4928–4938.
213. *Adinolfi M.* First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation / *Adinolfi M., Sherlock J.* // *Hum. Reprod. Update.* — 1997. — Vol. 3, N 4. — P. 383–392.
214. *Adolph S.* In situ nick translation of human metaphase chromosomes with the restriction enzymes *MspI* and *HpaII* reveals an R-band pattern / *Adolph S., Hameister H.* // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1990. — Vol. 54, N 3–4. — P. 132–136.
215. *Aiman J.* The frequency of androgen receptor deficiency in infertile men / *Aiman J., Griffin J.E.* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1982. — Vol. 54, N 4. — P. 725–732.
216. *Aitken R.J.* Fertilization without sperm / *Aitken R.J., Irvine D.S.* // *Nature.* — 1996. — Vol. 379. — P. 493–494.
217. *Albertini D.F.* Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during oogenesis and oocyte maturation / *Albertini D.F.* // *Mutat. Res.* — 1992. — Vol. 296, N 1–2. — P. 57–68.
218. *Alfi O.S.* Evidence for genetic control of nondisjunction in man / *Alfi O.S., Chang R., Azen S.P.* // *Am. J. Hum. Genet.* — 1980. — Vol. 32, N 4. — P. 477–483.
219. *Aller V.* Familial transmission of a duplication-deficiency X chromosome associated with partial Turner syndrome / *Aller V., Gargallo M., Abrisqueta J.* // *Clinic. Genet.* — 1995. — Vol. 48, N 6. — P. 317–320.
220. *Almeida P.A.* The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development in-vitro / *Almeida P.A., Bolton V.N.* // *Reprod. Fertil. Dev.* — 1996. — Vol. 8. — P. 235–241.
221. *Alonso R.A.* Cell cycle time and possible early DNA replication in C-band regions in the domestic pig (*Sus scrofa*) lymphocytes / *Alonso R.A., Cantu J.M.* // *Ann. Genet.* — 1983. — Vol. 26, N 4. — P. 202–205.
222. Amount variability of total and individual Ag-NOR proteins in cells stimulated to proliferate / *Sirri V.* [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* — 1995. — Vol. 43, N 9. — P. 887–893.
223. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy / *Templado C.* [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1996. — Vol. 74, N 3. — P. 194–200.

224. An analysis of human sperm chromosome breakpoints / Estop A.M. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 56, N 2. — P. 452–460.

225. An analysis of meiotic pairing in trisomy 21 oocytes using fluorescent in situ hybridization / Cheng E.Y. [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1998. — Vol. 80, N 1–4. — P. 48–53.

226. Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis / Hunt P., LeMaire R., Embury P. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1995. — Vol. 11, N 4. — P. 2007–2012.

227. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of 'hidden' mosaicism / Fernandez-Garcia R. [et al.] // *Clin. Genet.* — 2000. — Vol. 58, N 3. — P. 201–208.

228. Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques / Grimaldi P. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 4, N 12. — P. 1116–1121.

229. Andersen C.L. CpG islands detected by self-primed in situ labeling (SPRINS) / Andersen C.L., Koch J., Kjeldsen E. // *Chromosoma.* — 1998. — Vol. 107, N 4. — P. 260–266.

230. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism / Brown C.J. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1989. — Vol. 44, N 2. — P. 264–269.

231. Antequera F. CpG islands / Antequera F., Bird A. // *EXS.* — 1993. — Vol. 64. — P. 169.

232. Antequera F. Number of CpG islands and genes in human and mouse / Antequera F., Bird A. // *PNAS.* — 1993. — Vol. 90, N 24. — P. 11995–11999.

233. Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children / Avramopoulos D., Mikkelsen M., Vassilopoulos D. [et al.] // *Lancet.* — 1996. — Vol. 347, N 9005. — P. 862–865.

234. Application of "APT TEST" in prenatal diagnosis to evaluate the fetal origin of blood obtained by "chordocentesis". Results of 30 pregnancies / Odur G. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 4, N 1. — P. 155.

235. Application of fluorescence in situ hybridization techniques in clinical genetics: use two alphoid repeats probes detecting the centromere of chromosomes 13 and 21 or chromosomes 14 and 22, respectively / Kolvraa S. [et al.] // *Clin. Genet.* — 1991. — Vol. 39, N 4. — P. 278–286.

236. Arbusova S. Familial Down syndrome: evidence supporting cytoplasmic inheritance / Arbusova S., Cuckle H., Mueller R., Sehmi I. // *Clin. Genet.* — 2001. — Vol. 60, N 6. — P. 56–62.

237. Arbusova S. Possible role of mitochondrial DNA mutations in the etiology and pathogenesis of Down's syndrome / Arbusova S. // *BJMG.* — 2003. — Vol. 6, N 3–4 — P. 11–14.

238. Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor / Tomobe M. [et al.] // *J. Urol.* — 1999. — Vol. 162, N 1. — P. 63–68.

239. Arizawa M. Patological analysis of the placenta in trisomies 21, 18 and 13 / Arizawa M., Nakayama M. // *Nippon Sanka Fujinca Gakkai Zasshi.* — 1992. — Vol. 44, N 1. — P. 9–13.

240. Armstrong S.J. Meiotic segregation analysis by FISH investigation in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes / Armstrong S.J., Hulten M.A. // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 6, N 5. — P. 430–431.

241. Ashley T. G-band position on meiotic synapsis and crossing-over / Ashley T. // *Genetics.* — 1988. — Vol. 118, N 2. — P. 307–317.

242. Association between first trimester absence of fetal nasal bone on ultrasound and Down syndrome / Otano L., Aiello H., Igarzabal L. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2002. — Vol. 22, N 10. — P. 930–932.

243. Association between presenelin-1 polymorphism and maternal meiosis II errors in Down syndrome / Petersen M. B. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 93, N 5. — P. 366–372.

244. *Bahce M.* Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes? / Bahce M., Cohen J., Munne S. // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 1999. — Vol. 16, N 4. — P. 176–184.

245. *Bajoria R.* The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy / Bajoria R., Kingdom J. // *Prenat. Diagn.* — 1997. — Vol. 17, N 13. — P. 1207–1225.

246. *Baker T.G.* The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries / Baker T.G., Franchi L.L. // *J. Cell Sci.* — 1967. — Vol. 2, N 2. — P. 213–224.

247. Balanced translocation (10;13) in a father, ascertained through the study of meiosis in semen, and partial trisomy 10q in his son / Miro R. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1980. — Vol. 53, N 2. — P. 179–182.

248. Banding analysis of abnormal karyotypes in spontaneous abortion / Tadashi K. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1973. — Vol. 25. — P. 539–547.

249. *Baranov V.S.* Chromosomal control of early embryonic development in mice. I. Experiments on embryos with autosomal monosomy / Baranov V.S. // *Genetica (The Netherlands)*. — 1983. — N 61. — P. 165–177.

250. *Baranov V.S.* Chromosomal control of early embryonic development in mice. II. Experiments on embryos with structural rearrangements of autosomes 7, 9, 14 and 17 / Baranov V.S. // *Genet. Res.* — 1983. — Vol. 41, N 3. — P. 227–239.

251. *Baranov V.S.* Mice with Robertsonian translocations in experimental biology and medicine / Baranov V.S. // *Genetica (The Netherlands)*. — 1980. — Vol. 52–53. — P. 23–32.

252. *Bernardi G.* The isochore organization of human genome and its evolutionary history — a review / Bernardi G. // *Gene*. — 1995. — Vol. 135, N 1–2. — P. 57–66.

253. *Bernardi G.* The human genome: organization and evolutionary history / Bernardi G. // *Ann. Rev. Genet.* — 1995 — Vol. 29. — P. 445–476.

254. *Bernstein R.* Human inherited marker chromosome 22 short-arm enlargement: investigation of rDNA gene multiplicity, Ag-band size, and acrocentric association / Bernstein R., Dawson B., Griffiths J. // *Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 58, N 2. — P. 135–139.

255. *Bestor T.* Structure of mammalian DNA methyltransferase as deduced from the inferred amino acid sequence and direct studies of the protein / Bestor T. // *Biochem. Soc. Trans.* — 1988. — Vol. 16, N 6. — P. 944–947.

256. *Bestor T.H.* The host defence function of genomic methylation patterns / Bestor T. // *Novartis Found Symp.* — 1998. — Vol. 214. — P. 187–199.

257. *Bhasin S.* Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility / Bhasin S., De Krester D.M., Baker H.W.G. // *J. Clin. Endocrin. Metabol.* — 1994. — Vol. 79, N 6. — P. 1525–1529.

258. *Bicmore W.A.* Mammalian chromosome banding — an expression of genome organization / Bicmore W.A., Sumner A.T. // *Trends Genet.* — 1989. — Vol. 5, N 5. — P. 144–148.

259. *Binder G.* Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? / Binder G., Koch A., Wajs E., Ranke M.B. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1995. — Vol. 80, N 12. — P. 3532–3536.

260. *Bird A.* DNA methylation patterns and epigenetic memory / Bird A. // *Genes Dev.* — 2002. — Vol. 16, N 1. — P. 6–21.

261. *Bird A.* The essentials of DNA methylation / Bird A. // *Cell*. — 1992. — Vol. 70. — P. 5–8.

262. *Bird A.P., Wolffe A.P.* Methylation-induced repression — belts, braces, and chromatin // *Cell*. — 1999. — Vol. 99, N 5. — P. 451–454.

263. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from

men with nonmosaic Klinefelter's syndrome / Palermo G.D., Schlegel P.N., Sills E.S. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338, N 9. — P. 588–590.

264. *Blaicher W.* Acardiac twin pregnancy: association with trisomy 2 / Blaicher W., Repa C; Schaller A. // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, N 2. — P. 474–475.

265. *Blumenthal A.* Turner syndrome in a mother and daughter: r(X) and fertility / Blumenthal A., Allanson J. // *Clin. Genet.* — 1997. — Vol. 52, N 3. — P. 187–191.

266. *Boue A.* A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1,356 prenatal diagnoses / Boue A., Gallano P.A. // *Prenat. Diagn.* — 1984. — Vol. 4 (spec. issue). — P. 45–67.

267. *Boue A.* Fetal medicine: Prenatal diagnosis and management / Boue A. — N.-Y.: Oxford Univ. Press, 1995. — 292 p.

268. *Boue J.G.* Les aberrations chromosomiques dans les avortements spontanés humains / Boue J.G., Boue A. // *Press Med.* — 1970. — Vol. 78, N 14. — P. 635–641.

269. *Brambati B.* Methods of chorion villi sampling / Brambati B., Oldrini A. // *Chorion villus sampling* / Ed. B. Brambati. — N.-Y.: Livingstone, 1986. — P. 73–97.

270. Breakpoint analysis of Turner patients with partial Xp deletions: implications for the lymphoedema gene location / Boucher C.A. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 38, N 9. — P. 591–598.

271. *Breed A.S.P. M.* An evaluation of cytogenetic diagnosis by chorion villus sampling: reliability and implications / Breed A.S.P. M. — Groningen: STYX, 1992. — 175 p.

272. *Bresson J.* Diagnosis of Turners syndrome in a pregnant woman / Bresson J., Fellmann F., Schaaf J. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1997. — Vol. 77, N 1–2. — P. 103.

273. *Bulmer J.N.* Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy / Bulmer J.N., Rodeck C., Adinolfi M. // *Prenat. Diagn.* — 1995. — Vol. 15, N 12. — P. 1143–1153.

274. *Burgoyne P.S.* Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosome in mammals / Burgoyne P.S. // *Hum. Genet.* — 1982. — Vol. 61, N 2. — P. 85–90.

275. *Calton M.* DNA content of placental nuclei / Calton M. // *J. Cell Biol.* — 1962. — Vol. 13, N 2. — P. 87–93.

276. *Camargo M.* Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model / Camargo M., Cervenka J. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1982. — Vol. 34, N 5. — P. 757–780.

277. *Cameron F.J.* Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes / Cameron F.J., Sinclair A.H. // *Hum. Mutat.* — 1997. — Vol. 5, N 9. — P. 388–395.

278. *Capoa A.* The transcriptional activity of individual ribosomal DNA gene clusters is modulated by serum concentration / de Capoa A., Marleka P., Baldini A. // *J. Cell Sci.* — 1985. — Vol. 74. — P. 21–23

279. Cardiac malformations in the first-trimester fetuses with increased nuchal translucency: ultrasound diagnosis and postmortem morphology / Haak M.C. [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2002. — Vol. 20, N 1. — P. 14–21.

280. *Carpenter A.T.C.* The recombination nodule story — seeing what you are looking at / Carpenter A.T.C. // *Bioessays.* — 1994. — Vol. 16. — P. 69–74.

281. *Carr D.H.* Chromosome studies in selected spontaneous abortions. Polyploidy in man / Carr D.H. // *J. Med. Genet.* — 1971. — Vol. 8, N 2. — P. 164–174.

282. *Carr D.H.* Chromosome studies in spontaneous abortions / Carr D.H. // *J. Obstet. Gynecol.* — 1965. — Vol. 26. — P. 308–326.

283. *Carter N.P.* Cytogenetic analysis by chromosome painting / Carter N.P. // *Cytometry.* — 1994. — Vol. 18. — P. 2–10.

284. *Casal M.L.* In utero transplantation of fetal liver cells in the mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low-level chimerism, but overexpression of beta-glucuronidase can delay onset of clinical signs / Casal M.L., Wolfe J.H. // *Blood.* — 2001. — Vol. 97, N 6. — P. 1625–1634.

285. *Caspari D.* Discrepant karyotypes after second and third trimester combined placentalcentesis/amniocentesis / Caspari D., Bartels I., Rauskolb R. // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14, N 7. — P. 569–576.

286. *Cattanach B.M.* Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice / Cattanach B.M., Kirk M. // *Nature.* — 1985. — Vol. 315, N 6019. — P. 496–498.

287. Centrosome-specific perturbations during in vitro maturation of mouse oocytes exposed to cocaine / Combelles C. [et al.] // *Exp. Cell Res.* — 2000. — Vol. 260, N 1. — P. 116–126.

288. *Chaillot J.R.* Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis / Chaillot J.R., Vogt T.F., Beier D.R., Leder P. // *Cell.* — 1991. — Vol. 66, N 1. — P. 77–83.

289. *Chandley A.* Genetic contribution to male infertility / Chandley A. // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13, N 3. — P. 76–88.

290. *Chang H.-C.* In vitro characteristics of human fetal cells obtained from chorionic villus sampling and amniocentesis / Chang H.-C., Jones O.W. // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 5. — P. 367–378.

291. *Chang P.* Y-chromosome microdeletion in a father and his four sons / Chang P., Sauer M., Brown S. // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, N 11. — P. 2689–2694.

292. Characterization of susceptible chiasma configuration that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21 / Lamb N. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1997. — Vol. 6, N 9. — P. 1391–1399.

293. Chemical mutation genesis in mammals and man / Eds. F. Vogel, G. Rohrborn — Berlin: Springer-Verlag, 1970. — 519 p.

294. *Chen J.* Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance / Chen J., Pikaard K. // *Genes and Development.* — 1997. — Vol. 11, N 16. — P. 2124–2136.

295. *Chen Z.* Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in Arabidopsis allopolyploids / Chen Z., Comai L., Pikaard C. // *PNAS.* — 1998. — Vol. 95, N 25. — P. 14891–14896.

296. *Cheng E.Y.* A fluorescent in situ hybridization analysis of X chromosome pairing in early human female meiosis / Cheng E.Y., Gartler S.M. // *Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 94, N 4. — P. 389–394.

297. *Cheng E.Y.* Chromosome painting analysis of early oogenesis of trisomy 18 / Cheng E.Y., Chen Y.J., Gartler S.M. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1995. — Vol. 70, N 3–4. — P. 205–210.

298. *Choo K.* Evolution of alpha-satellite DNA on human acrocentric chromosomes / Choo K., Vissel B., Earle E. // *Genomics.* — 1989. — Vol. 5, N 2. — P. 332–344.

299. *Choo K.* Role of acrocentric cen-pter satellite DNA in Robertsonian translocation and chromosomal non-disjunction / Choo K. // *Mol. Biol. Med.* — 1990. — Vol. 7, N 5. — P. 437–449.

300. Chorionic mosaicism: association with fetal loss but not with adverse perinatal outcome / Wapner R.J. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1992. — Vol. 12, N 5. — P. 347–355.

301. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample / Bender M.A. [et al.] // *Mutat. Res.* — 1988. — Vol. 204, N 3. — P. 421–433.

302. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes / Martin R.H. [et al.] // *J. Reprod. Fertil.* — 1986. — Vol. 78, N 2. — P. 673–678.

303. Chromosomal mosaicism in Turner's syndrome / Vyatkina S. [et al.] // *BJMG.* — 2004. — Vol. 7, N 1–2. — P. 17–22.

304. Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testis of men with non-obstructive azoospermia / Martin R.H. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, N 5. — P. 1121–1124.

305. Chromosome findings in 2500 second trimester amniocentesis / Crandall B.F. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 1980. — Vol. 5, N 4. — P. 345–356.
306. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene / Xu G.L. [et al.] // *Nature.* — 1999. — Vol. 402, N 6758. — P. 187–191.
307. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development / Rougier N. [et al.] // *Genes Dev.* — 1998. — Vol. 12, N 14. — P. 2108–2113.
308. Chromosome mosaicism in chorionic villi: outcome of pregnancy in 52 cases and placenta studies with in situ hybridization / Leschot N.Y. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1992. — Suppl. — P. 182.
309. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro / Magli M.G. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, N 8. — P. 1781–1786.
310. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood / Moorhed P.S., Nowell P.C., Millman W.J. [et al.] // *Exp. Cell Res.* — 1960. — Vol. 20. — P. 613–616.
311. Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes / Durban M. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13, N 3. — P. 583–587.
312. Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals / Brandriff B., Gordon L., Ashworth L. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1985. — Vol. 70, N 1. — P. 18–24.
313. *Claussen U.* A pipette method for rapid karyotyping in prenatal diagnosis / *Claussen U., Klein R., Schmidt M.* // *Prenat. Diagn.* — 1986. — Vol. 6, N 6. — P. 401–408.
314. Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm / Marquez C. [et al.] // *Cytogen. Cell Genet.* — 1996. — Vol. 72, N 2–3. — P. 164–170.
315. *Collins F.* In the crossfire: Collins on genomes, patents and 'rivalry' / *Collins F.* // *Science.* — 2000. — Vol. 287, N 5462. — P. 2396–2398.
316. *Collins F.S.* Genome research: the next generation // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* — 2003. — Vol. 68. — P. 49–54.
317. Combined cytogenetic and Y-chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection / Van der Ven K. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 3, N 8. — P. 699–704.
318. Comparative study of microsatellite and cytogenetic markers for detecting the origin of the nondisjoined chromosome 21 in Down syndrome / Petersen M.B. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 51, N 3. — P. 516–525.
319. Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in situ hybridization / Bernardini L. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 3, N 5. — P. 431–438.
320. Complementary replication R — and G-band patterns induced by cell bloking at the R-band / G band transition, a possible regulatory checkpoint within the S phase of the cell cycle / Fetni R. [et al.] // *Cytogen. Cell Genet.* — 1996. — Vol. 75, N 2–3. — P. 172–179.
321. *Conconi A.* Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle / *Conconi A., Widmer R.M., Koller T., Sogo J.M.* // *Cell.* — 1989. — Vol. 57, N 5. — P. 753–761.
322. Confined placental mosaicism in CVS and pregnancy outcome / Roland B. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14, N 7. — P. 589–593.
323. Congenital bilateral absence of the vas deference: a primarily genital form of cystic fibrosis / Anguiano A. [et al.] // *JAMA.* — 1992. — Vol. 267, N 13. — P. 1794–1797.
324. Connecting nuclear architecture and genomic function / Berezney R. [et al.] // *J. Cell Biochem.* — 1996. — Vol. 62, N 2. — P. 223–226.
325. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos / Dean W. [et al.] // *PNAS.* — 2001. — Vol. 98, N 24. — P. 13734–13738.

326. Consortium Ihgs. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature*. — 2001. — Vol. 409, N 6822. — P. 860–921.
327. *Constancia M.* Imprinting mechanisms / *Constancia M., Pickard B., Kelsey G., Reik W.* // *Genome Res.* — 1998. — Vol. 8, N 9. — P. 881–900.
328. *Constantine G.* Placental biopsy in the third trimester of pregnancy / *Constantine G., Fowlie, Pearson J.* // *Prenat. Diagn.* — 1992. — Vol. 12, N 10. — P. 783–788.
329. Constitutive expression of the C-H-ras oncogene inhibits doxorubicin-induced apoptosis and promotes cell survival in a rhabdomyosarcoma cell lines / *Nooter K., Boersma A.W., Oostrum R.G.* [et al.] // *Br. J. Cancer.* — 1995. — Vol. 71, N 3. — P. 556–561.
330. *Conte R.A.* Counterstained enhancement of Taq I resistant sites after distamycin A-DAPI treatment / *Conte R.A., Verma R.S.* // *Histochem.* — 1994. — Vol. 102, N 6. — P. 433–435.
331. *Coonen E.* Application of in-situ hybridization techniques to study human preimplantation embryos: a review / *Coonen E., Hopman A.H.P., Geraedts J.P.M., Ramaekers F.C.S.* // *Hum. Reprod. Update.* — 1998. — Vol. 4, N 2. — P. 135–152.
332. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case-control study of placentas at delivery / *Stipoljev F.* [et al.] // *Fetal. Diagn. Ther.* — 2001. — Vol. 16, N 1. — P. 4–9.
333. *Costa M.* Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis: gene silencing by nickel delivery to the nucleus and gene activation/inactivation by nickel-induced cell signaling / *Costa M., Yan Y., Zhao D., Salnikow K.* // *J. Envir. Monit.* — 2003. — Vol. 5, N 2. — P. 222–223.
334. *Costello J.F.* Methylation matters / *Costello J.F., Plass C.* // *J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 38, N 5. — P. 285–303.
335. *Counce S.J.* Differentiation of the synaptonemal complex and kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy / *Counce S.J., Meyer G.F.* // *Chromosoma.* — 1973. — Vol. 44, N 2. — P. 231–253.
336. *Craig J.M.* The distribution of CpG islands in mammalian chromosome / *Craig J.M., Bickmore W.A.* // *Nat. Genet.* — 1994. — Vol. 7, N 3. — P. 376–382.
337. *Crane J.P.* An embryonic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue / *Crane J.P., Cheung S.W.* // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 2. — P. 119–129.
338. *Cronier L.* Regulation of gap junctional communication during human trophoblast differentiation / *Cronier L., Herve J.C., Deleze J., Malassine A.* // *Microsc. Res. Tech.* — 1997. — Vol. 38, N 1–2. — P. 21–28.
339. Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities / *Lissens W.* [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 14, N 11. — P. 55–78.
340. Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF / *Plachot M.* [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1989. — Vol. 4, N 1. — P. 99–103.
341. Cytogenetic analysis of chorionic villi for prenatal diagnosis: an ACC collaborative study of U.K. data. Association of clinical cytogeneticists working party on chorionic villi in prenatal diagnosis. // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14, N 5. — P. 363–379.
342. Cytogenetic analysis of human blastocysts / *Clouston H.J.* [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2002. — Vol. 22, N 12. — P. 1143–1152.
343. Cytogenetic and molecular findings in patients with Turner's syndrom stigmata / *Kuznetzova T.* [et al.] // *J. Med. Genet.* — 1995. — Vol. 32, N 12. — P. 962–967.
344. Cytogenetic results from the U.S. collaborative study on CVS / *Ledbetter D.H.* [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1992. — Vol. 12, N 2. — P. 317–345.
345. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: high success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study / *Ledbetter D.H.* [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1990. — Vol. 162, N 2. — P. 495–501.
346. *Daffos F.* Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by

ultrasound. Report of 66 cases / Daffos F., Capella-Pavlovsky M., Forestier F. // *Prenat. Diagn.* — 1983. — Vol. 3, N 4. — P. 271–277.

347. *Daniel A.* Risk of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian Laboratories / Daniel A., Hook E.B., Wulf G. // *Am. J. Med. Genet.* — 1989. — Vol. 31, N 1. — P. 14–53.

348. *Davie J.R.* Histone modification, chromatin structure, and the nuclear matrix / Davie J.R. // *J. Cell Biochem.* — 1996. — Vol. 62, N 2. — P. 149–157

349. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells / Lei H., Oh S.P., Okano M. [et al.] // *Development.* — 1996. — Vol. 122, N 10. — P. 3195–3205.

350. *Debrot S.* Tetrasomy 16 in the mouse: more severe condition than the corresponding trisomy / Debrot S., Epstein C. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* — 1986. — Vol. 91. — P. 169–180.

351. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization / Selig S. [et al.] // *EMBO J.* — 1992. — Vol. 11, N 3. — P. 1217–1225.

352. *Delozier-Blanchet C.D.* B.Trisomy 7 in chorionic villi: follow-up studies of pregnancy, normal child, and placental clonal anomalies / Delozier-Blanchet C.D., Engel E., Extermann P., Pastori B. // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 4. — P. 281–286.

353. *Derick-Tan J.S.* The significance of alpha-feto-protein (AFP) and human chorionic gonadotropin (HCG) during first trimester of pregnancy / Derick-Tan J.S., Zehfuss I., Taubert H.D. // *Geburtshilfe frauenheilkol.* — 1982. — Vol. 42, — N1. — P. 29–34.

354. *Dernburg A.F.* Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation / Dernburg A.F., Sedat J.W., Hawley R.S. // *Cell.* — 1996. — Vol. 86, N 1. — P. 135–146.

355. Detailed physical map of human chromosomal region 11q12-13 shows high meiotic recombination rate around the MEN1 locus / Janson M. [et al.] // *PNAS.* — 1991. — Vol. 88, N 23. — P. 10609–10613.

356. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection / Pang M.G. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, N 5. — P. 1266–1273.

357. Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy / Garcia M. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1987. — Vol. 77, N 3. — P. 223–232.

358. Development of the human dispermic embryo / Sathananthan A.H. [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* — 1999. — Vol. 5, N 5. — P. 553–560.

359. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage / Sandalinas M., Sadowy S., Alikani M. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 16, N 9. — P. 1954–1958.

360. Developmental biology and pathology /Eds. A. Gropp, K. Benirschke — Berlin: Springer-Verlag, 1976. — 185 p.

361. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line / Kafri T. [et al.] // *Genes Dev.* — 1992. — Vol. 6, N 5. — P. 705–714.

362. Devriendt K. Genetic control of intra-uterine growth / Devriendt K. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2000. — Vol. 92, N 1. — P. 29–34.

363. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse / Sanford J.P. [et al.] // *Genes and Dev.* — 1987. — Vol. 1, N 10. — P. 1039–1046.

364. Dilemma of trisomy 20 mosaicism detected prenatally: is it an innocent finding? / Reish O. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 1998. — Vol. 77, N 1. — P. 72–75.

365. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens / Dork T. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 100, N 3–4. — P. 365–377.

366. Diverse spermatogenetic defects in human caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene / Reijo R. [et al.] // *Nat. Genet.* — 1995. — Vol. 10, N 4. — P. 383–393.
367. DNA base sequence is not the only factor for restriction endonuclease activity on metaphase chromosomes: evidence using isoschizomeres / Gosalvez J. [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1989. — Vol. 50, N 2–3. — P. 142–144.
368. DNA global hypomethylation in EBV-transformed interphase nuclei / Habib M. [et al.] // *Exp. Cell Res.* — 1999. — Vol. 249, N 1. — P. 46–53.
369. DNA methylation in extraembryonic lineages of mammals / Sanford J.P. [et al.] // *Trends Genet.* — 1985. — Vol. 1. — P. 89–93.
370. DNA methylation/histone methylation switch regulates rDNA gene dosage control and nucleolar dominance / Lawrence R. [et al.] // *Mol. Cell.* — 2004. — Vol. 13, N 4. — P. 599–609.
371. DNA replication asynchrony between the paternal and maternal alleles of imprinted genes does of straddle the R/G transition / Drouin R. [et al.] // *Chromosoma.* — 1997. — Vol. 106, N 6. — P. 405–411.
372. *Doerfler W.* DNA methylation and gene activity / Doerfler W. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1983. — Vol. 52. — P. 93–124.
373. Down's syndrome in the male. Reproductive pathology and meiotic studies / Johannisson R., Gropp A., Winking H., [et al.] // *Hum. Genet.* — 1983. — Vol. 63, N 2. — P. 132–138.
374. Ductus venosus studies in fetuses at high risk for chromosomal or heart abnormalities: relationship with nuchal translucency measurement and fetal outcome / Bilardo C.M., Muller M.A., Zikulnig L. [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2001. — Vol. 17, N 4. — P. 288–294.
375. *Dumont M.C.* Differential associative behavior of mitotic and meiotic acrocentric chromosomes / Dumont M.C., Bello M.J., Guichaoua O.L. // *Hum. Genet.* — 1989. — Vol. 82, N 1. — P. 35–39.
376. *Dupont J.-M.* Three year national survey of prenatal cytogenetic activity in France 1998–2000 / Dupont J.-M., Carles E. // *E.C.A., Newsletter.* — 2004, N 13. — P. 3–8.
377. *Dyban A.* A cytogenetic study of G1-chromosomes in one-cell stage mouse embryo and in corresponding second polar body. Evaluation of aneuploidy originated in females heterozygous for translocation T[14;15]6Ca / Dyban A., Fredine M., Noniashvili E. // *Int. J. Dev. Biol.* — 1997. — Vol. 41, N 6. — P. 859–866.
378. *Dyban A.* Ocadaic acid induced premature chromosome condensation reflecting the cell cycle progress in one-cell stage mouse embryos / Dyban A., De Sutter P., Verlinsky Y. // *Mol. Reprod. Dev.* — 1993. — Vol. 34, N 4. — P. 402–415.
379. *Dyban A.* Preimplantation cytogenetic analysis / Dyban A., De Sutter P., Verlinsky Y. // *Preimplantation diagnosis of genetic diseases: a new technique in assisted reproduction.* — N.-Y.: Wiley-Liss, 1993. — P. 93–127.
380. *Dyban A.P., Baranov V.S.* Cytogenetics of mammalian embryonic development / Dyban A.P., Baranov V.S. — Oxford: Clarendon Press, 1987. — 362 p.
381. Dynamics of DNA replication factories in living cells / Leonhardt H. [et al.] // *J. Cell Biol.* — 2000. — Vol. 149, N 2. — P. 271–279.
382. Dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Russia / Baranov V.S. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1993. — Vol. 13, N 5. — P. 323–333.
383. Early pregnancy / Exalto N. [et al.] — Mannheim: Boehringer Ingelheim, 1983. — 216 p.
384. Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives / Eds. M. Macek, D.W. Bianchi, H. Cuckle — Prague: The Karolinum Press, 2002. — 426 p.
385. *Eberl D.F.* The role of heterochromatin in the expression of a heterochromatic gene,

the rolled locus of *Drosophila melanogaster* / Eberl D.F., Duyf B.J., Hilliker A.J. // *Genetics*. — 1993. — Vol. 134, N 1. — P. 277–292.

386. *Edirisinghe W.R.* Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an in-vitro fertilisation programme / Edirisinghe W.R., Murch A.R., Yovich J.L. // *Hum. Reprod.* — 1992. — Vol. 7, N 2. — P. 230–236.

387. *Edwards R.* On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility / Edwards R., Bishop C. // *Mol. Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 3, N 7. — P. 549–554.

388. *Edwards R.G.* Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos / Edwards R.G., Beard H.B. // *Mol. Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 3, N 10. — P. 863–905.

389. Effective priming of neonates born to immune dams against the immunogenic pseudorabies virus glycoprotein gD by replication-incompetent adenovirus-mediated gene transfer at birth / Monteil M. [et al.] // *J. Gen. Virol.* — 1997. — Vol. 78, N 12. — P. 3303–3310.

390. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation / Takiguchi M., Achanzar W.E., Qu W. [et al.] // *Exp. Cell Res.* — 2003. — Vol. 286, N 2. — P. 355–365.

391. Efficient direct trisomy analysis and enzyme determinations from chorionic villi sampling in the first trimester of pregnancy / Simoni G. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1983. — Vol. 63, N 4. — P. 349–357.

392. *Ehrlich M.* DNA methylation: normal development, inherited diseases and cancer / Ehrlich M. // *J. Clin. Ligand Assay*. — 2000. — Vol. 23. — P. 144–146.

393. *Eichenlaub-Ritter U.* Alterations in the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: An immunofluorescent study / Eichenlaub-Ritter U., Chandley A.C., Gosden R.G. // *Chromosoma*. — 1986. — Vol. 94, N 5. — P. 337–345.

394. *Eichenlaub-Ritter U.* Nondisjunction, disturbances in spindle structure, and characteristics of chromosome alignment in mature oocytes in mice heterozygous for Robertsonian translocations / Eichenlaub-Ritter U., Winking H. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1990. — Vol. 54, N 1–2. — P. 47–54.

395. *Eichenlaub-Ritter U.* Genetics of oocyte aging / Eichenlaub-Ritter U. // *Maturitas*. — 1998. — Vol. 30, N 2. — P. 143–169.

396. *Eichenlaub-Ritter U.* Mechanisms of nondisjunction in mammalian meiosis / Eichenlaub-Ritter U. // *Curr. Top. Devel. Biol.* — 1994. — Vol. 29. — P. 281–324.

397. Electron microscopy and biochemical analysis of mouse metaphase chromosomes after digestion with restriction endonucleases / Gosalvez J. [et al.] // *Chromosoma*. — 1990. — Vol. 99, N 1. — P. 36–43.

398. *Elgin S.C.R.* Heterochromatin: Silence is golden / Elgin S.C.R., Grewal S.H.S. // *Current Biol.* — 2004. — Vol. 13, N 23. — P. 895–898.

399. *Elledge S.J.* Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis / Elledge S.J. // *Science*. — 1996. — Vol. 274, N 5293. — P. 1664–1672.

400. *Ellison J.* PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome / Ellison J., Wardak Z., Young M. // *Hum. Mol. Genet.* — 1997. — Vol. 6, N 8. — P. 1341–1347.

401. Elucidation the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans / Savage A.R. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7, N 8. — P. 1221–1227.

402. *Engel E.* Genomic imprinting and uniparental disomy in medicine: clinical and molecular aspects / Engel E., Antonarakis S.E. — N.-Y.: Wiley-Liss Inc., 2002. — 304 p.

403. *Engel E.* Imprinting is also a mechanism for immediate or delayed hemizygous expression of several uniparental haplotypes selected from the genome of each sex / Engel E. // *Am. J. Med. Genet.* — 1997. — Vol. 70, N 1. — P. 95–98.

404. Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells / Tada T. [et al.] // *Dev. Genes Evol.* — 1998. — Vol. 207, N 8. — P. 551–561.

405. *Epner E.* Asynchronous DNA replication within the human β -globin gene locus / *Epner E., Forrester W.C., Groudine M.* // PNAS. — 1988. — Vol. 85, N 21. — P. 8081–8085.
406. ESHRE PGD Consortium: Preliminary assesement of data from January 1997 to September 1998 // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, N 12. — P. 3138–3148.
407. Estimate of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm / *Bischoff F.Z., Nguyen D.D., Burt K.J.* [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1994. — Vol. 66, N 4. — P. 237–243.
408. EUCROMIC: Quality Guidelines and standards for Genetic laboratories/clinics in prenatal diagnosis on fetal samples obtained by invasive procedures // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 5, N 6. — P. 342–350.
409. Evaluation of cytogenetic analysis for clinical preimplantation diagnosis / *Santalo J.* [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1995. — Vol. 64, N 1. — P. 44–50.
410. Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1 / *Zinn A.R.* [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 63, N 6. — P. 1757–1766.
411. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis / *Hawkins J.R.* [et al.] // *Am J. Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 51, N 5. — P. 979–984.
412. Evidence for methylation of inactive human rRNA genes in amplified regions / *Tantravahi U.* [et al.] // *Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 56, N 3. — P. 315–320.
413. Evidence from Turners syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function / *Skuse D.* [et al.] // *Nature.* — 1997. — Vol. 387, N 6634. — P. 705–708.
414. *Evsikov S.* Mosaicism in inner cell mass of human blastocysts / *Evsikov S., Verlinsky Y.* // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13, N 11. — P. 3151–3155.
415. *Evsikov S.V.* Preimplantation development of manipulated mouse zygotes fused with the second polar bodies: a cytogenetic study / *Evsikov S.V., Evsikov A.V.* // *Int. J. Dev. Biol.* — 1994. — Vol. 38, N 4. — P. 725–730.
416. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells / *Wu J., Issa J.P., Herman J.* [et al.] // PNAS. — 1993. — Vol. 90, N 19. — P. 8891–8895.
417. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm / *Elliot D.* [et al.] // PNAS. — 1997. — Vol. 94, N 8. — P. 3848–3853.
418. Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation / *Kay G.F., Penny G.D., Patel D.* [et al.] // *Cell.* — 1993. — Vol. 72, N 2. — P. 171–182.
419. *Farber R.A.* Differences in the order of termination of DNA replication in human chromosomes in peripheral blood lymphocytes and skin fibroblasts from the same individual / *Farber R.A., Davidson R.L.* // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1977. — Vol. 18, N 6. — P. 349–363.
420. *Fedorova I.* FISH analysis of aneuploidy in spermatozoa / *Fedorova I., Loginova Y., Kuznetzova T.* // *Cytogen. Cell Genet.* — 1999. — Vol. 77, N 1–2. — P. 61.
421. *Feigelson J.* Anomalies du sperme, des deferents et de l'epididyme dans la mucoviscidose / *Feigelson J., Pecau Y.* // *La Presse Medicale.* — 1986. — Vol. 15, N 11. — P. 523–525.
422. *Ferraro M.* Differential gene activity visualized on sister replication in the presence of 5-azacytidine / *Ferraro M., Lavia P.* // *Chromosoma.* — 1985. — Vol. 91, N 3–4. — P. 307–312
423. Fertility and pregnancy outcome in Danish women with Turner syndrome / *Birkebaek N.H.* [et al.] // *Clin. Genet.* — 2002. — Vol. 61. — P. 35–39.
424. Fetal sex prediction by sex chromatin of chorion villi cells during pregnancy // *Chin. Med. J.* — 1975. — Vol. 1, N 2. — P. 117–126.
425. First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation / *Angell R.R.* [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1994. — Vol. 65, N 3. — P. 194–202.

426. First trimester amniofiltration: technical, cytogenetic and pregnancy outcome of 104 consecutive procedures / Burne D.L. [et al.] // Br. J. Obstetr. Gynecol. — 1995. — Vol. 102. — P. 220–223.

427. First trimester fetal diagnosis of genetic disorders: clinical evaluation of 250 cases / Brambati B. [et al.] // J. Med. Genet. — 1985. — Vol. 22, N 2. — P. 92–99.

428. First trimester prenatal diagnosis using endocervical lavage: a negative evaluation / Goldberg M.F. [et al.] // Am. J. Obstetr. Gynecol. — 1980. — Vol. 138, N 4. — P. 436–439

429. FISH-deletion mapping defines a 270-kb short stature critical interval in the pseudoautosomal region PAR1 on human sex chromosomes / Rao E. [et al.] // Hum. Gen. — 1997. — Vol. 100, N 2. — P. 236–239.

430. *Flake A.W.* In utero stem cell transplantation / Flake A.W. // Best. Pract. Res. Clin. Obstetr. Gynecol. — 2004. — Vol. 18, N 6. — P. 941–958.

431. Fluorescence in situ hybridisation analysis and ovarian histology of women with Turner syndrome presenting with Y-chromosomal material: a correlation between oral epithelial cells, lymphocytes and ovarian tissue / Hanson L. [et al.] // Hereditas. — 2002. — Vol. 137, N 1. — P. 1–6.

432. *Ford C.E.* Mosaicism and chimeras / Ford C.E. // Br. Med. Bull. — 1969. — Vol. 25. — P. 104–109.

433. Forty-four probands with an additional marker chromosome / Buckton K.E. [et al.] // Hum. Genet. — 1985. — Vol. 69, N 4. — P. 353–370.

434. *Foudila T.* Turner's syndrome and pregnancies after oocyte donation / Foudila T., Soderstrom-Anttila V., Hovatta O. // Hum. Reprod. — 1999. — Vol. 14, N 2. — P. 532–535.

435. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma / Greger V. [et al.] // Hum. Genet. — 1994. — Vol. 94, N 5. — P. 491–496.

436. Functional interrelationships between nuclear structure and transcriptional control: contribution to regulation of cell-cycle — and tissue specific gene expression / Stein G.S. [et al.] // J. Cell. Biochem. — 1996. — Vol. 62, N 2. — P. 198–209.

437. *Gabriel-Robez O.* The meiotic pairing behaviour in human spermatocytes carrier of chromosome anomalies and their repercussions on reproductive fitness / Gabriel-Robez O., Rumbler Y. // Ann. Genet. — 1994. — Vol. 37, N 1. — P. 3–10.

438. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin / Cronier L. [et al.] // Endocrinol. — 1994. — Vol. 135, N 1. — P. 402–408.

439. *Gebrane-Younes J.* When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA / Gebrane-Younes J., Fomproix N., Hernandez-Verdun D. // J. Cell Sci. — 1997. — Vol. 110., Pt. 19. — P. 2429–2440.

440. Genetic analysis of mosaicism in 53 women with Turner syndrome / Hanson L. [et al.] // Hereditas. — 2001. — Vol. 134, N 2. — P. 153–159.

441. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor / Berta P., Hawkins J.R., Sinclair A.H. [et al.] // Nature. — 1990. — Vol. 348, N 6300. — P. 448–450.

442. *Gilles C.B.* The pachytene synaptonemal complex complement of the cat / Gilles C.B., Cowan S.K. // Genetica. — 1985. — Vol. 67. — P. 99–107.

443. *Girardi S.* Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men / Girardi S., Mielnik A., Schlegel P. // Hum. Reprod. — 1997. — Vol. 12, N 8. — P. 1635–1641.

444. *Golubovsky M.D.* Oocytes physically and genetically link three generations: genetic/demographic implications / Golubovsky M.D., Manton K. // Environment and Human Health: Materials of International Ecological Forum, 27–29 July, 2003. — St.-Petersburg, 2003. — P. 354–356.

445. *Golubovsky M.D.* Postzygotic diploidization of triplids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning / Golubovsky M.D. // *Hum. Reprod.* — 2003. — Vol. 18, N 2. — P. 236–242.

446. *Gonzales I.* Complete sequence of the 43-Kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer / Gonzales I., Sylvester J. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1991. — Vol. 57, N 4. — P. 175–178.

447. *Goto T.* Expression of an Xist promoter-luciferase construct during spermatogenesis and in preimplantation embryos: regulation by DNA methylation / Goto T., Christians E., Monk M. // *Mol. Reprod. Dev.* — 1998. — Vol. 49, N 4. — P. 356–367.

448. *Goto T.* Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and human / Goto T., Monk M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. — Vol. 62, N 2. — P. 362–378.

449. *Griffin D.K.* The incidence, origin and etiology of aneuploidy / Griffin D.K. // *Int. Rev. Cytol.* — 1996. — Vol. 167. — P. 263–295.

450. *Guillen A.K.* Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees / Guillen A.K., Hirai Y., Tanoue T., Hirai H. // *Chromosome Res.* — 2004. — Vol. 12, N 3. — P. 225–237.

451. *Guttenbach M.* Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberration. A review / Guttenbach M., Engel W., Schmid M // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 100, N 1. — P. 1–21.

452. *Hahnemann J.M.* Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS) — diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986–1992 / Hahnemann J.M., Vejerslev L.O. // *Prenat. Diagn.* — 1997. — Vol. 17, N 9. — P. 801–817.

453. *Hahnemann N.* Chromosome studies in induced abortions / Hahnemann N. // *Clin. Genet.* — 1973. — Vol. 4, N 4. — P. 328–332.

454. *Hahnemann N.* Early prenatal diagnosis: A study of biopsy techniques and cell culturing from extra-embryonic membrane / Hahnemann N. // *Clin. Genet.* — 1974. — Vol. 6, N 4. — P. 294–306.

455. *Handyside A.H.* Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises / Handyside A.H., Delhanty J.D.A. // *TIG.* — 1997. — Vol. 13, N 7. — P. 270–275.

456. *Hardy K.* The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro / Hardy K., Handyside A.H., Winston R.M.L. // *Development.* — 1989. — Vol. 107, N 3. — P. 597–604.

457. *Hassold T.* To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy / Hassold T., Hunt P. // *Nat. Rev. Genet.* — 2001. — Vol. 2, N 4. — P. 280–291.

458. *Hassold T.* Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21 / Hassold T., Sherman S. // *Clin. Genet.* — 2000. — Vol. 57, N 2. — P. 95–100.

459. *Hassold T.* The origin of human nondisjunction: two hits to trisomy / Hassold T. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1999. — Vol. 85, N 1–2. — P. 7.

460. *Hassold T.* Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals / Hassold T., Sherman S., Hunt P. // *Hum. Mol. Genet.* — 2000. — Vol. 9, N 16. — P. 2409–2419.

461. *Hawley R.S.* Separation anxiety: the etiology of nondisjunction in flies and people / Hawley R.S., Frazier J.A., Rasooly R. // *Hum. Mol. Genet.* — 1994. — Vol. 3, N 9. — P. 1521–1528.

462. *Hecht F.* The nonrandomness of human chromosome abnormalities / Hecht F. // *Population Cytogenetics. Studies in humans* / Eds. E.B. Hook, I.N. Porter. — N.-Y., London: Academic Press, 1977. — P. 237–250.

463. *Henderson A.* Location of ribosomal DNA in human chromosome complement / Henderson A., Warburton D., Atwood K. // *PNAS.* — 1972. — Vol. 69, N 11. — P. 3394–3398.

464. *Henderson A.* Satellite-association frequency and rDNA content of a double-satellited chromosome / Henderson A., Atwood K. // *Hum. Genet.* — 1976. — Vol. 31, N 1. — P. 113–115.
465. *Henderson S.A.* Chiasms frequency and maternal age in mammals / Henderson S.A., Edwards R.G. // *Nature.* — 1968. — Vol. 218, N 136. — P. 22–28.
466. *Hendrich B.* Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG-binding proteins / Hendrich B., Bird A. // *Mol. Cell Biol.* — 1998. — Vol. 18, N 11. — P. 6538–6547.
467. *Hendrich B.* Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation / Hendrich B., Bird A. // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* — 2000. — Vol. 249. — P. 55–74.
468. *Hertig A.T.* A description of 34 human ova within the first 17 days of development / Hertig A.T., Rock J., Adams E.C. // *Am. J. Anat.* — 1956. — Vol. 98, N 3. — P. 435–459.
469. *Heyting C.* Synaptonemal complexes: structure and function / Heyting C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1996. — Vol. 8, N 3. — P. 389–396.
470. High frequency of well-defined Y-chromosomal deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome / Foresta C. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13, N 2. — P. 302–307.
471. *Hirahara F.* A case of tracheal agenesis delivered in patient with mosaic Turners syndrome / Hirahara F., Miyagi E., Yamanaka M. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 1995. — Vol. 58, N 2. — P. 207–209.
472. *Hodgson C. P.* The vector void in gene therapy / Hodgson C. P. // *Biotechnology.* — 1995. — Vol. 13, N 3. — P. 222–225.
473. *Holmquist G.P.* Chromosome bands, their chromatin flavours and their functional features / Holmquist G.P. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 51, N 1. — P. 17–37.
474. *Holmquist G.P.* Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression / Holmquist G.P. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1987. — Vol. 40, N 2. — P. 151–173.
475. *Holms J.M.* Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization / Holms J.M., Martin K.H. // *Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 91, N 1. — P. 20–24.
476. *Holsclaw D.S.* Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis / Holsclaw D.S., Perlmutter A.D., Jockin H., Shwachman H.H. // *J. Urol.* — 1971. — Vol. 106, N 4. — P. 568–574.
477. *Holzgreve W.* Prenatal karyotyping: when, whom and how? / Holzgreve W., Terzanli S., Schneider H.P. G., Miny P. // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 1992. — Vol. 2, N 1. — P. 64–69.
478. *Holzgreve W.* Enrichment of fetal cells and free fetal DNA from maternal blood: An insight into the Basel experience / Holzgreve W., Zhong X.Y., Burk M.R., Hahn S. // *Early Pregnancy.* — 2001. — Vol. 5, N 1. — P. 43–44.
479. *Hook E., Warburton D.* The distribution of chromosomal genotypes associated with Turners syndrome: live birth prevalence rates & evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities of mosaicism / Hook E., Warburton D. // *Hum. Genet.* — 1983. — Vol. 64, N 1. — P. 24–27.
480. *Howell W.M.* Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloid developer: a one step method / Howell W.M., Black D.A. // *Experientia.* — 1980. — Vol. 36, N 8. — P. 10–14.
481. *Howlett S.K.* Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development / Howlett S.K., Reik W. // *Development.* — 1991. — Vol. 113, N 1. — P. 19–27.
482. *Hsu L.Y.F.* Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis / Hsu L.Y.F. // *Genetic disorders and the fetus. Diagnosis, prevention, and treatment* / Ed. A. Milunsky — Baltimore: The John Hopkins Univ. Press, 1992. — P. 155–210.
483. *Hsu T.C.* Human and mammalian cytogenetics / Hsu T.C. — N.-Y.: Springer-Verlag, 1979. — 186 p.

484. *Hulten M.* Low chiasmata count and other meiotic irregularities in two infertile 46,XY men with spermatogenic arrest / Hulten M., Eliasson R., Tillinger K.G. // *Hereditas*. — 1970. — Vol. 65, N 2. — P. 285–290.
485. Human centromeric DNAs / Lee C. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 100, N 3–4. — P. 291–304.
486. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY / Ferlin A. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, N 7. — P. 1710–1716.
487. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion / Egozcue S. [et al.] // *Hum. Repr. Update*. — 2000. — Vol. 6, N 1. — P. 93–105.
488. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Y q11 / Vogt P.H. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1996. — Vol. 5, N 7. — P. 933–943.
489. *Hunt P.A.* The control of mammalian female meiosis: factors that influence chromosome segregation / Hunt P.A. // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 1997. — Vol. 15, N 2. — P. 246–252.
490. *Hurt E.* Nucleus and gene expression. Nuclear compartments and nuclear machines / Hurt E., Schutz G. // *Curr. Opin in Cell Biol.* — 1998. — Vol. 10, N 3. — P. 301–303
491. *Hyett T.T.* Increased nuchal translucency in trisomy 21 fetues: relations to narrowing of the aortic isthmus / Hyett T.T., Moscoso G., Nicolaides R. // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 11. — P. 3049–3051.
492. Hypomethylation of classical satellite DNA and chromosome instability in lymphoblastoid cell lines / Almeida A. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 91, N 6. — P. 538–546.
493. Hypomethylation of human sperm pronuclear chromosomes / Martorell M.R., Navarro J., Marquez C.[et al.] // *Cytogen. Cell Genet.* — 1997. — Vol. 76, N 3–4. — P. 123–127.
494. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas / Narayan A., Ji W., Zhang X.Y., Marrogi A. [et al.] // *Int. J. Cancer* — 1998. — Vol. 77, N 6. — P. 833–838.
495. Identification of chromosomal bands replicating early in the S phase of normal human fibroblasts / Cohen S.M. [et al.] // *Exp. Cell Research*. — 1998. — Vol. 245, N 2. — P. 321–329.
496. Identification of the gene-richest bands in human chromosomes / Saccone S. [et al.] // *Gene*. — 1996. — Vol. 174, N 1. — P. 85–94.
497. IHGSC (International Human Genome Sequencing Consortium) Initial sequencing analysis of the human genome // *Nature*. — 2001. — Vol. 409. — P. 860–921.
498. *Illmensee K.* Cloning in reproductive medicine / Illmensee K. // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2000. — Vol. 18, N 8. — P. 451–467.
499. Immunolocalization of α -tubulin, γ -tubulin and CENP-E in male Rat and male mouse meiotic divisions: pathway of meiosis I spindle formation in mammalian spermatocytes / Kallio M. [et al.] // *Devel. Biol.* — 1998. — Vol. 195, N 1. — P. 29–37.
500. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island / Wutz A., Smrzka O.W., Schweifer N. [et al.] // *Nature*. — 1997. — Vol. 389, N 6652. — P. 745–749.
501. In situ nick-translation distinguishes between active and inactive X chromosomes / Kerem B.S. [et al.] // *Nature*. — 1983. — Vol. 304, N 5921. — P. 88–90.
502. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men / Guttenbach M. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 12, N 3. — P. 468–472.
503. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XXY male assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH) / Blanco J. [et al.] // *Hum Genet.* — 1997. — Vol. 99, N 3. — P. 413–416.
504. Increased risk of Alzheimer's disease in mothers of adults with Down's syndrome / Schupf N. [et al.] // *Lancet*. — 1994. — Vol. 344, N 8919. — P. 353–356.
505. Inheritance of ribosomal gene activity and level of DNA methylation of individual

gene clusters in a three generation family / de Capoa A. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1991. — Vol. 88, N 2. — P. 146–152.

506. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin / Amiel A. [et al.] // *J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 46, N 5. — P. 245–250.

507. Interphase cytogenetics on paraffin-embedded sections of ovary for detection of genomic constitution in a patient with Turner's syndrome and chromosomal mosaicism / Novak A. [et al.] // *Hum. Gen.* — 1995. — Vol. 95, N 3. — P. 293–298.

508. Intracytoplasmic sperm injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of the human spermatozoa / Rybouchkin A. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 5. — P. 130–1135.

509. Investigation of chorion villi after chorion villus sampling (CVS). Correlation of morphological with clinical and laboratory data / Ruschoff J. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1989. — Vol. 81, N 4. — P. 329–334.

510. ISCN (2005): An international system for human cytogenetic nomenclature / L.G. Shaffer, N. Tommerup // S. Karger, Basel. — 2005. — 130 p.

511. *Islam M.Q.* A new fixation procedure for improved quality G-bands in routine cytogenetic work / Islam M.Q., Levan G. // *Hereditas.* — 1987. — Vol. 107. — P. 127–130.

512. Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase / Yen R.W., Vertino P.M., Nelkin B.D. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1992. — Vol. 20, N 9. — P. 2287–2291.

513. *Ivaschenko T.E.* Simplified direct PCR method for prenatal diagnosis of cystic fibrosis / Ivaschenko T.E., Malysheva O.V., Kuznetzova T.V., Baranov V.S. // *News Letter Eur. Assoc. CF.* — 1991, N 4. — P. 7.

514. *Jacobs P.* The origin of numerical chromosome abnormalities / Jacobs P., Hassold T. // *Adv. Genet.* — 1995. — Vol. 33. — P. 101–133.

515. *Jacobs P.* Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study / Jacobs P., Dalton P., James R. // *Ann. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 61, N 6. — P. 471–483.

516. *Jaenisch R.* Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals / Jaenisch R., Bird A. // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 33, N 1. — P. 245–254.

517. *Jagiello G.M.* Complete autosomal chromomere maps of human early and mid/late pachytene spermatocytes / Jagiello G.M., Fang J.-S. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1982. — Vol. 34, N 1. — P. 112–124.

518. *James R.M.* A chimeric animal model for confined placental mosaicism / James R.M., West J.D. // *Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 93, N 5. — P. 603–604.

519. *James R.S.* A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes / James R.S., Temple J.K., Dennis N.R., Crolla J.A. // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 3, N 1. — P. 21–26.

520. *James S.* Abnormal folate metabolism and mutation in the methylen tetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome / James S., Pogribna M., Pogribny I. // *Am. J. Clin. Nutrition.* — 1999. — Vol. 70, N 4. — P. 495–501.

521. *Jamieson M.E.* The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro / Jamieson M.E., Coutts J.R., Connor J.M. // *Hum. Reprod.* — 1994. — Vol. 9, N 4. — P. 709–715.

522. *Jauniaux E.* Chromosomally abnormal early ongoing pregnancies: correlation of ultrasound and placental histological findings / Jauniaux E., Hustin J. // *Hum. Pathol.* — 1998. — Vol. 29, N 11. — P. 1195–1199.

523. *Jeanpierre M.* Human satellites 2 and 3 / Jeanpierre M. // *Ann. Genet.* — 1994. — Vol. 37, N 4. — P. 163–171.

524. *Jirasek E.* Prenatal development: growth and differentiation / Jirasek E. // *Gynecol.*

and Obstet. / Ed. J.W. Sciarra. — Philadelphia: Harper and Row Publ., 1984. — Chapter 14. — P. 1–11.

525. *Johnson A.* Mosaicism in chorionic villus sampling: an association with poor perinatal outcome / Johnson A., Wapner R.J., Jackson L.G. // *Obstet. Gynecol.* — 1990. — Vol. 75, N 4. — P 573–577.

526. *Johnson M.* Genetic risk of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening / Johnson M. // *Fertil. Steril.* — 1998. — Vol. 70, N 3. — P. 397–411.

527. *Jourina D.S.* Influence of parental origin on Ag-activity of individual NORs in human chorionic villus cells / Jourina D.S., Pendina, A.A., Kuznetzova T.V. // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 11, N 1. — P. 135–136.

528. *Kalousek D.K.* Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions / Kalousek D.K., Dill F.J. // *Science.* — 1983. — Vol. 221, N 4611. — P. 665–667.

529. *Kalousek D.K.* Confined placental mosaicism / Kalousek D.K., Vekemans M. // *J. Med. Genet.* — 1996. — Vol. 33, N 7. — P. 529–533.

530. *Kalousek D.K.* Confined placental mosaicism identified by molecular analysis / Kalousek D.K., Barrett I. // *Pediatr. Pathol.* — 1994. — Vol. 14, N 1. — P. 151–159.

531. *Kalousek D.K.* Current topic: confined placental mosaicism and intrauterine fetal development / Kalousek D.K. // *Placenta.* — 1994. — Vol. 15, № 3. — P. 219–230.

532. *Kalousek D.K.* Genomic imprinting related to prenatal diagnosis / Kalousek D.K., Barrett I. // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14. — P. 1191–1201.

533. *Kalousek D.K.* Insights into intrauterine placental and fetal relationships from the cytogenetic perspective / Kalousek D.K. // *Cs. Pediatr.* — 1997. — Vol. 52, N 7. — P. 523–529.

534. *Kalter H.* Medical progress. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention / Kalter H., Warkany J. // *N. Engl. J. Med.* — 1983. — Vol. 308, N 8. — P. 424–431.

535. *Kamiguchi J.* Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method / Kamiguchi J., Rosenbuch B., Stersik K., Mikamo K. // *Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 90, N 5. — P. 533–541.

536. *Kamiguchi Y.* An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova / Kamiguchi Y., Mikamo K. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1986. — Vol. 38, N 5. — P. 724–740.

537. *Kan Y.W.* Fetal blood sampling in utero / Kan Y.W., Valenti C., Guidotti R. // *Lancet.* — 1974. — Vol. 1, N 7847. — P. 79–80.

538. *Kaplowitz P.B.* Monozygotic twins discordant for Ulrich-Turner syndrome / Kaplowitz P.B., Bodurtha J., Brown J., Spence J.E. // *Am. J. Med. Genet.* — 1991. — Vol. 41, N 1. — P. 78–82.

539. *Kautiainen T.L.* DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture / Kautiainen T.L., Jones P.A. // *J. Biol. Chem.* — 1986. — Vol. 261, N 4. — P. 1594–1598.

540. *Kazy Z.* Chorion biopsy in early pregnancy: a method for early prenatal diagnosis for inherited disorders / Kazy Z., Rozovsky I.S., Bakharev V.A. // *Prenat. Diagn.* — 1982. — Vol. 2, N 4. — P. 39–40.

541. *Kennerknecht I.* A modified embryonic model to explain embryonic/extraembryonic chromosomal inconsistencies / Kennerknecht I., Vogel W., Mehnert W. // *Prenat. Diagn.* — 1993. — Vol. 13, N 12. — P. 1156–1159.

542. *Kennerknecht I.* Proliferation kinetics in native chorionic villus cell / Kennerknecht I., Baur-Aubele S., Vogel W. // *Prenat. Diagn.* — 1991. — Vol. 11, N 8. — P. 591–595.

543. *Kennerknecht I.* Nuclear and chromosomal replication patterns in chorionic villi cells by bromodeoxyuridine labelling and DNA flow cytometry / Kennerknecht I., Baur-Aubele S., Terinde R., Vogel W. // *Cell. Prolif.* — 1992. — Vol. 25, N 4. — P. 321–336.

544. *Khastgir G.* Oocyte donation in Turners syndrome an analysis of the factors affecting the outcome / *Khastgir G., Abdalla H., Thomas A.* // *Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 12, N 2. — P. 279–285.

545. *Knoffler M.* Regulation of HCG during normal gestation and in pregnancies affected by Down's syndrome / *Knoffler M.* // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 5, N 10. — P. 895–897.

546. *Knudson A.G.* Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma / *Knudson A.G.* // *PNAS.* — 1971. — Vol. 68, N 4. — P. 820–823.

547. *Knutsen T.* Chromosome analysis guidelines — preliminary report / *Knutsen T., Bixenman H.A., Lawce H., Martin P. K.* // *Cytogen. Cell Genet.* — 1990. — Vol. 54, N 1–2. — P. 1–4.

548. *Koehler K.E.* Human aneuploidy: lessons from achiasmate segregation in *Drosophila melanogaster* / *Koehler K.E., Hassold T.J.* // *Annu. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62. — P. 467–479.

549. *Koehler K.E.* Recombination and nondisjunction in humans and flies / *Koehler K.E., Hawley R.S., Sherman S., Hassold T.J.* // *Hum. Mol. Genet.* — 1996. — Vol. 5. — P. 1495–1504.

550. *Kogoma T.* Recombination by replication / *Kogoma T.* // *Cell.* — 1996. — Vol. 85, N 5. — P. 625–627.

551. *Kola I.* Trippronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos / *Kola I., Trounson A., Dawson G., Rogers P.* // *Biol. Reprod.* — 1987. — Vol. 37, N 2. — P. 395–401.

552. *Krawczak M.* Mutation process in pathology and evolution / *Krawczak M., Cooper D.N.* // *Human Genome Evolution* / Eds. E. Jackson, T. Strachan, G. Dover. — Oxford: Bios Sci. Publ., 1996. — P. 1–34.

553. *Krawetz S.* In situ localization of a mammalian proamine gene: parameters affecting specificity of hybridization / *Krawetz S., Herfort M., Dixon G.* // *Genome.* — 1990. — Vol. 33, N 3. — P. 459–463.

554. *Kullander S.* Fetal chromosome analysis after transcervical placental biopsies during early pregnancy / *Kullander S., Sandahl B.* // *Acta Obstetr. Gynecol. Scand.* — 1973. — Vol. 52, N 4. — P. 355–358.

555. *Kuo M.T.* Nick translation of metaphase chromosomes: in vitro labeling of nuclease-hypersensitive regions in chromosomes / *Kuo M.T., Plunkett W.* // *PNAS.* — 1985. — Vol. 82, N 3. — P. 854–858.

556. *Kurilo L.F.* Oogenesis in antenatal development in man / *Kurilo L.F.* // *Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 57, N 1. — P. 86–92.

557. *Kurreck J.* Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications / *Kurreck J.* // *Eur. J. Biochem.* — 2003. — Vol. 270, N 8. — P. 1628–1644.

558. *Kuznetzova T.* Application of nick translation in situ for chromosome studies in human embryogenesis / *Kuznetzova T., Volodina N., Pendina A., Baranov V.* // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1997. — Vol. 77, N 1–2. — P. 33.

559. *Kuznetzova T.V.* Morphological and functional peculiarities of the metaphase chromosomes in human embryos / *Kuznetzova T.V., Baranov V.S.* // *Chrom. Res.* — 1995. — Vol. 3, N 1. — P. 90.

560. *Laird P.W.* The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics / *Laird P.W., Jaenisch R.* // *Annu. Rev. Genet.* — 1996. — Vol. 30 — P. 441–464.

561. *Lange R.* Analyses of meiotic chromosomes in testicular biopsies of infertile patients / *Lange R., Krause W., Engel W.* // *Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 12, N 10. — P. 2154–2158.

562. *Langer S.* Multicolor chromosome painting in diagnosis and research applications / *Langer S., Kraus J., Jentsch I., Spicher M.R.* // *Chrom. Res.* — 2004. — Vol. 12, N 1. — P. 15–23.

563. *Lapina E.* The effects of diagnostic ultrasound exposure on the meiotic prophase in rats oocytes / *Lapina E., Krasnikova O., Kuznetzova T.* // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 10, N 1. — P. 153.

564. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development / Ko M.S. [et al.] // *Development*. — 2000. — Vol. 127, N 8. — P. 1737–1749.

565. Late chorionic villus sampling: cytogenetic aspects / Dalpra L. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1993. — Vol. 13, N 11. — P. 239–246.

566. *Ledbetter D.H.* Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis / Ledbetter D.H., Engel E. // *Hum. Mol. Genet.* — 1995. — Vol. 5. — P. 1757–1764.

567. *LeMaire-Adkins R.* Lack of checkpoint control at metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females / LeMaire-Adkins R., Radke K., Hunt P.A. // *J. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 139, N 7. — P. 1611–1619.

568. *Lercher M.J.* A unification of mosaic structures in the human genome / Lercher M.J., Urrutia A.O., Pavlicek A., Hurst L.D. // *Hum. Mol. Genet.* — 2003. — Vol. 12, N 19. — P. 2411–2415.

569. *Lechner W.* Paternal repression of the imprinted mouse *Igf2r* locus occurs during implantation and is stable in all tissues of the post implantation mouse embryo / Lechner W., Barlow D.P. // *Mech. Dev.* — 1997. — Vol. 61, N 1–2. — P. 141–149.

570. *Lestou V.S.* Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth / Lestou V.S., Kalousek D.K. // *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* — 1998. — Vol. 79. — P. F223–F226.

571. *Lezhava T.A.* The activity of nucleolar organizer regions of human chromosomes in extreme old age / Lezhava T.A. // *Gerontology*. — 1984. — Vol. 30, N 2. — P. 94–99.

572. *Li E.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality / Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. // *Cell*. — 1992. — Vol. 69, N 6. — P. 915–926.

573. *Lighten A.* IGF2 is parentally imprinted in human preimplantation embryos / Lighten A., Hardy K., Winston R., Moore G.E. // *Nat. Genet.* — 1997. — Vol. 15, N 2. — P. 122–123.

574. *Lim A.S.T.* Chromosomes of oocytes failing in-vitro fertilization / Lim A.S.T., Ho A.T.N., Tsakok M.F.H. // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 10. — P. 2570–2575.

575. *Lin M.S.* Asynchronous DNA replication between 15q11.2q12 homologs: cytogenetic evidence for maternal imprinting and delayed replication / Lin M.S., Zhang A., Fujimoto A. // *Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 96, N 5. — P. 572–576.

576. Lineage tracing demonstrates that blastomeres of early cleavage-stage human pre-embryos contribute to both trophoblast and inner cell mass / Mottla G.L. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 2. — P. 384–91.

577. *Lo Y.M.* Fetal RhD genotyping from maternal plasma / Lo Y.M. // *Ann. Med.* — 1999. — Vol. 31, N 5. — P. 308–312.

578. Logistic regression model to estimate the risk of unbalanced offspring in reciprocal translocations / Cans C. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 92, N 6. — P. 598–604.

579. *Loidl J.* Cytological aspects of meiotic recombination / Loidl J. // *Experientia*. — 1994. — Vol. 50, N 3. — P. 285–294.

580. Long term maintenance and differentiation of male germ cells in culture / Rassoulzadegan M. [et al.] // VII Workshop on Mol. Genet. of the mice, 15–18 May 1992. — Dourdan, 1992. — P. 42.

581. Longitudinal differentiation of the human Yq heterochromatin as revealed by the restriction enzyme *TaqI* / Fernandez-Piqueras J. [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1991. — Vol. 57, N 2–3. — P. 78–81.

582. Long-range analyses of the centromeric regions of human chromosomes 13, 14 and 21: identification of a narrow domain, containing two key centromeric DNA elements / Trowell H. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1993. — Vol. 10, N 2. — P. 1639–1649.

583. *Lorda-Sanchez I.* Molecular study of 45,X conceptuses: correlation with clinical findings / Lorda-Sanchez I., Binkert F., Maechler M., Schinzel A. // *Am. J. Med. Genet.* — 1992. — Vol. 42, N 4. — P. 487–490.

584. *Lucchini R.* Replication of transcriptionally active chromatin / Lucchini R., Sogo J.M. // *Nature*. — 1995. — Vol. 374, N 6519. — P. 276–280.
585. *Luciani J.* Identification of pachytene bivalent in human male meiosis using a banding technique / Luciani J., Morazzani M.-R., Stahl A. // *Chromosoma*. — 1975. — Vol. 52, N 3. — P. 275–282.
586. *Luciani J.M.* An air-drying method for first meiotic prophase preparations from mammalian ovaries / Luciani J.M., Dvictor-Vuillet M., Gagne R., Stahl A. // *J. Reprod. Fertil.* — 1974. — Vol. 36, N 2. — P. 409–411.
587. *Luo S.H.* XIST expression is repressed when X-inactivation is reserved in human placental cells: a model for study of XIST regulation / Luo S.H., Torchia B.S., Migeon B.R. // *Somat. Cell Molec. Genet.* — 1995. — Vol. 21, N 1. — P. 51–60.
588. *Lyon M.F.* X-chromosome inactivation / Lyon M.F. // *Curr. Biol.* — 1999. — Vol. 9, N 7. — P. R235–R237.
589. *Madan K.* Paracentric inversion in men / Madan K., Seabright M., Lindenbaum R.H., Bobrow M. // *J. Med. Genet.* — 1984. — Vol. 21, N 6. — P. 407–412.
590. *Magee A.* Ullrich-Turner syndrome: seven pregnancies in an apparent 45,X woman / Magee A., Nevin N., Armstrong M. // *Am. J. Med. Gen.* — 1998. — Vol. 75, N 1. — P. 1–3.
591. *Malheiro I.* Specific induction of uncoiling in NORs of human acrocentric chromosomes by 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine / Malheiro I., Porto B., Mello-Sampayo T., Goyanes V. // *Cytobios.* — 1995. — Vol. 83, N 332. — P. 17–23.
592. *Manotoya T.* Oocytes in prophase of meiosis from squash preparations of human fetal ovaries / Manotoya T., Potter E.L. // *Fertil. Steril.* — 1963. — Vol. 14. — P. 378–392.
593. Mapping of DNase I sensitive regions on mitotic chromosomes / Kerem B.S. [et al.] // *Cell*. — 1984. — Vol. 38, N 2. — P. 493–499.
594. *Markert C. L.* Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells / Markert C. L., Petters R.M. // *Science*. — 1978. — Vol. 202, N 4363. — P. 56–58.
595. *Markert C. L.* Parthenogenesis, homozygosity and cloning in mammals / Markert C. L. // *J. Hered.* — 1982. — Vol. 73, N 6. — P. 390–397.
596. *Marquez C.* Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping / Marquez C., Cohen J., Munne S. // *Cytogen. Cell Genet.* — 1998. — Vol. 81, N 3–4. — P. 254–258.
597. *Martin R.H.* Detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes / Martin R.H. // *Cytogen. Cell Genet.* — 1983. — Vol. 35, N 4. — P. 252–256.
598. *Martin R.H.* Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes / Martin R.H., Ko E., Rademaker A.W. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1991. — Vol. 39, N 3. — P. 321–331.
599. *Martin R.H.* Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosome / Martin R.H., Rademaker A. // *Cytogen. Cell Genet.* — 1999. — Vol. 86, N 1. — P. 43–45.
600. *Martin-DeLeon P.A.* Patterns of silver staining in cell of six-day blastocyst and kidney fibroblasts of the domestic rabbit / Martin-DeLeon P. A., Fleming M.E., Petrosky D.L. // *Chromosoma*. — 1978. — Vol. 67, N 3. — P. 245–252.
601. *Martin-DeLeon P.A.* Location of the 18S and 28S rRNA cistrons in the genome of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L) / Martin-DeLeon P.A. // *Cytogen. Cell Genet.* — 1980. — Vol. 28, N 1–2. — P. 34–40.
602. *Martinez-Flores I.* Effects of female fertility and germinal cells in prepubertal and adult rats (*Rattus norvegicus*) after X-ray irradiation / Martinez-Flores I., Egozcue J., Garsia M. // *Reproductive Toxicology*. — 1998. — Vol. 444. — P. 215–219.
603. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes / Pellestor F., Andreo B., Arnal F. [et al.] // *Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 112, N 2. — P. 195–203.

604. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction / Hassold T. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 69, N 2. — P. 434–439.
605. Maternal uniparental disomy 14 as a cause of intrauterine growth retardation and early onset of puberty / Fokstuen S [et al.] // *J. Pediatr.* — 1999. — Vol. 134, N 6. — P. 689–695.
606. Maternal uniparental disomy 7 — review and further delineation of the phenotype / Kotzot D. [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* — 2000. — Vol. 159, N 4. — P. 247–256.
607. Maternal uniparental disomy for chromosome 2 in association with confined placental mosaicism for trisomy 2 and severe intrauterine growth retardation / Webb A.L. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1996. — Vol. 16, N 10. — P. 958–962.
608. Maternal uniparental isodisomy for chromosome 14 detected prenatally / Ralph A. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1999. — Vol. 19, N 7. — P. 681–684.
609. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation / Chudoba I. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 7, N 5. — P. 533–540.
610. *Mattei M.-G.* Heterochromatin, from chromosome to protein / Mattei M.-G., Luciani J. // *Eur. Cytogenet. Assoc. Newsletter.* — 2003. — Vol. 11. — P. 3–13.
611. MBD2 is a transcriptional repressor, belonging to the McCP1 histone deacetylase complex / Ng H.H., Zhang Y., Hendrich B., Johnson C. A. [et al.] // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23, N 1. — P. 58–61.
612. *McGrath J.* Nuclear and cytoplasmic transfer in mammalian embryos / McGrath J., Solter D. // *Dev. Biol.* — 1986. — Vol. 4. — P. 37–55.
613. *McPhaul M.J.* Molecular defects of the androgen receptor / McPhaul M.J. // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 69, N 1–6. — P. 315–322.
614. Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes / Pellestor F., Andreo B., Arnal F. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17, N 8. — P. 2134–2145.
615. Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males / Vidal F. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1982. — Vol. 60, N 1. — P. 301–304.
616. Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal growth restriction / Robinson W.P. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 60, N 4. — P. 917–927.
617. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocation: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescent in situ hybridization / Rousseaux S. [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1995. — Vol. 71, N 3. — P. 240–246.
618. Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation / Templado C. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1984. — Vol. 67, N 2. — P. 162–165.
619. Meiotic studies in series of 1100 infertile males / Egozcue J. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1983. — Vol. 65, N 2. — P. 185–188.
620. *Meneveri R.* Molecular organization and chromosomal location of human GC-rich heterochromatic blocks / Meneveri R., Agresti A., Marozzi A., Saccone S. // *Gene.* — 1993. — Vol. 123, N 2. — P. 227–234.
621. *Mercier S.* Analysis of chromosome equipment in spermatozoa of a 46,XY/47,XY/+8 male by means of multicolour fluorescence in situ hybridization: confirmation of a mosaicism and evaluation of risk for offspring / Mercier S., Bresson J.L. // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 99, N 1. — P. 42–46.
622. Methyionine syntase (MTR) 2756 (A&G) polymorphism, double heterozygoty methyionine synthase 2756 AG/methyionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome / Bosco P. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 2003. — Vol. 121A, N 3. — P. 219–224.
623. *Mezzanotte R.* Chromatin organization and restriction endonuclease activity on

human metaphase chromosomes / Mezzanotte R., Bianchi U., Vanni R., Ferrucci L. // *Cytogen. Cell. Genet.* — 1983. — Vol. 36, N 3. — P. 562–566.

624. Microdeletion in the Y chromosome of infertile men / Pryor J. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 336, N 8. — P. 534–539.

625. Microsatellite analysis in Turner syndrome: parental origin of X chromosomes and possible mechanism of formation of abnormal chromosomes / Monroy N. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 2002. — Vol. 107, N 3. — P. 181–189.

626. Microtubules in the metaphase-arrested mouse oocytes turn over rapidly / Gorbsky G.J. [et al.] // *PNAS.* — 1990. — Vol. 87, N 16. — P. 6049–6053.

627. Mikamo K. Anatomic and chromosomal anomalies in spontaneous abortions / Mikamo K. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1970. — Vol. 106, N 2. — P. 243–254.

628. Mikamo K. Colchicine-induced abnormal meiotic chromosomal segregation in primary oocytes of the Chinese hamster. Part II. Anaphase lagging / Mikamo K., Sugawara S. // *Jinrui Idengaku Zasshi.* — 1980. — Vol. 25, N 3. — P. 241–248.

629. Mikelsaar A.V. Comparison of silver staining of nucleolus organizer region in human lymphocytes and fibroblasts / Mikelsaar A.V., Schwarzacher H.G. // *Hum. Genet.* — 1978. — Vol. 42, N 3. — P. 291–299

630. Mikkelsen M. Chromosome analysis on chorionic villi / Mikkelsen M. // *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* — 1987. — Vol. 1, N 3. — P. 533–546.

631. Miller B. Nucleolar organizer regions: a potential prognostic factor in adenocarcinoma of the endometrium / Miller B., Morris M., Silva E. // *Gynecol. Oncol.* — 1994. — Vol. 54, N 2. — P. 37–41.

632. Miller O.J. 5-Methylcytosine localized in mammalian constitutive heterochromatin / Miller O.J., Schnedl W., Allen J., Erlanger B.F. // *Nature.* — 1974. — Vol. 251, N 5476. — P. 636–637.

633. Minderer S. The nasal bone in fetuses with trisomy 21: sonographic versus pathomorphological findings / Minderer S., Gloning K.P., Henrich W., Stoger H. // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2003. — Vol. 22, N 1. — P. 16–21.

634. Mintz B. Genetic mosaicism in vivo: development and disease in allophenic mice / Mintz B. // *Fed. Proc.* — 1971. — Vol. 30, N 3. — P. 935–943.

635. Miny P. Validity of cytogenetic analyses from trophoblast tissue throughout gestation / Miny P., Basaran S., Pawlowitzki I.H. // *Am. J. Med. Genet.* — 1989. — Vol. 33, N 1. — P. 136–141.

636. Mirre C. Association of ribosomal genes in the fibrillar center of the nucleolus: a factor influencing translocation and nondisjunction in the human meiotic oocyte / Mirre C., Hartung M., Stahl A. // *PNAS.* — 1980. — Vol. 77, N 10. — P. 6017–6021.

637. Mitchell A.R. Hypomethylation of human heterochromatin detected by restriction enzyme nick translation / Mitchell A.R. // *Exp. Cell Res.* — 1992. — Vol. 202, N 3. — P. 203–206.

638. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos / Brenner C.A., Wolny Y.M., Barritt J.A. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 4, N 9. — P. 887–892.

639. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with maternal age / Antonarakis S.E. [et al.] // *Nat. Genet.* — 1993. — Vol. 3, N 2. — P. 146–150.

640. Mittwoch U. Unpaired chromosomes at meiosis: Cause or effect of ganetogenic insufficiency? / Mittwoch U., Mahadevaivah S.K. // *Cytogen. Cell Genet.* — 1991. — Vol. 59, N 4. — P. 274–279.

641. Modlinski J. Method for visualizing the chromosomes of the second polar body of the mouse eggs / Modlinski J., McLaren A. A. // *J. Emryol. Exp. Morphol.* — 1980. — Vol. 60. — P. 93–97.

642. Mohr J. Fetal genetic diagnosis: development of techniques for early sampling of fetal cells / Mohr J. // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* — 1968. — Vol. 73, N 1. — P. 73–77.

643. Molecular diagnosis of Turner's syndrome / Gicquel C. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 1992. — Vol. 29, N 8. — P. 547–551.
644. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses / Hassold T. [et al.] // *Hum. Gen.* — 1992. — Vol. 89, N 6. — P. 647–652.
645. *Monk M.* Methylation and the X chromosome / Monk M. // *Bioessays.* — 1986. — Vol. 4, N 5. — P.204–208.
646. *Monk M.* Temporary and regular changes in DNA methylation in embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development / Monk M., Boubelik M., Lehnort S. // *Develop.* — 1987. — Vol. 99, N 3. — P. 371–375.
647. *Morita Y.* Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass / Morita Y., Tilly J.L. // *Devel. Biol.* — 1999. — Vol. 213, N 1. — P. 1–17.
648. Mosaicism for trisomy 12: four cases with varying outcomes / Bischoff F.Z. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1995. — Vol. 15, N 11. — P. 1017–1026.
649. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depends on the two sex chromosomes / Held K. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 88, N 3. — P. 288–294.
650. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos / Harper J.C. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1995. — Vol. 15, N 1. — P. 41–49.
651. *Moses M.J.* Meiosis, synaptonemal complex, and cytogenetic analysis / Moses M.J. // *Bioregulation of Reproduction* / Eds. G. Jagiello, H.J. Vogel — N.-Y.: Acad. Press, 1981. — P. 187–206.
652. *Moss T.* At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA / Moss T. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2004. — Vol. 14, N 2. — P. 210–217.
653. Multicolour FISH defects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients / Delhanty J.D.A. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 99, N 6. — P. 755–760.
654. *Munne S.* Chromosome abnormalities in human embryos / Munne S., Cohen J. // *Hum. Reprod. Update.* — 1998. — Vol. 4, N 6. — P. 842–855.
655. *Murthy K.D.S.* Recurrent regular trisomy-21 in two bedouin families Parental mosaicism versus genetic predisposition / Murthy K.D.S., Farag T.I. // *Ann. Genet.* — 1995. — Vol. 38, N 4. — P. 217–224.
656. *Murthy S.K.* Mitotic disturbances associated with inversion 9qh. A case report / Murthy S.K., Prabhakara K. // *Ann. Genet.* — 1990. — Vol. 33, N 3. — P. 169–172.
657. *Murthy S.K.* Nucleolus organizer region(s) activity and acrocentric chromosome association in Down syndrome / Murthy S.K. // *Indian J. Exp. Biol.* — 1987. — Vol. 25, N 6. — P. 363–366.
658. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis / Greenblatt M.S. [et al.] // *Cancer Res.* — 1994. — Vol. 54, N 18. — P. 4855–4878.
659. *Nadler H.L.* Patterns of enzyme development utilizing cultivated human fetal cells derived from amniotic fluid / Nadler H.L. // *Biochem. Genet.* — 1968. — Vol. 2, N 2. — P. 119–126.
660. *Nan X.* Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins / Nan X., Cross S., Bird A. // *Novartis Found Symp.* — 1998. — Vol. 214. — P. 6–21.
661. *Nan X.* MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin / Nan X., Campoy F.J., Bird A. // *Cell.* — 1997. — Vol. 88, N 4. — P. 471–481.
662. Nasal bone length throughout gestation: normal ranges based on 3537 fetal ultrasound measurements / Sonek J.D., McKenna D., Webb D. [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2003. — Vol. 21, N 2. — P. 152–155.
663. *Nath J.* Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men / Nath J., Tucker J., Hando J. // *Chromosoma.* — 1995. — Vol. 103, N 10. — P. 725–731.

664. *Nazarenko S.A.* High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients / Nazarenko S.A., Timoshevsky V.A., Sukhanova N.N. // *Clin. Genet.* — 1999. — Vol. 56, N 1. — P. 59–65.

665. *Neumann B.* Characteristics of imprinted genes / Neumann B., Kubicka P., Barlow D.P. // *Nat. Genet.* — 1995. — Vol. 9, N 1. — P. 12–13.

666. *Newell-Price J.* DNA methylation and silencing of gene expression / Newell-Price J., Adrian J.L., King C., King P. // *TEM.* — 2000. — Vol. 11, N 4. — P. 142–148.

667. *Niazi M.* Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi / Niazi M., Coleman D.V., Loeffler F.E. // *Br. J. Obstet. Gynecol.* — 1981. — Vol. 88, N 11. — P. 1081–1085.

668. *Nicolaides K.N.* Down's syndrome screening in the UK / Nicolaides K.N., Sebire N.J., Snijders R., Johnson S. // *Lancet.* — 1996. — Vol. 347, N 9049 — P. 906–907.

669. *Nicolis Y.* NORs and satellite associations in a family with 13;14 translocation / Nicolis Y., Kekic V., Diklic V. // *Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 59, N 4. — P. 342–344.

670. No evidence for genomic imprinting in liveborn Down syndrome patients / Stoll C. [et al.] // *Ann. Genet.* — 1995. — Vol. 38, N 1. — P. 13–18.

671. No induction of chromosome aberration in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields / Tateno H. [et al.] // *Mut. Res.* — 1998. — Vol. 414, N 1–3. — P. 31–35.

672. Non-convation of mammalian preimplantation methylation dynamics / Beaujean N. [et al.] // *Curr. Biol.* — 2004. — Vol. 14, N 7. — P. R266–R267.

673. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a / Ramsahoye B.H. [et al.] // *PNAS.* — 2000. — Vol. 97, N 10. — P. 5237–5242.

674. Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes / Williams B.J. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1993. — Vol. 2, N 11. — P. 1929–1936.

675. Non-disjunction of chromosome 18 / Bugge M. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7, N 4. — P. 661–669.

676. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-depend mechanism involving reduced recombination / Sherman S.L. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1994. — Vol. 3, N 9. — P. 1529–1535.

677. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells / Massari A., Novelli G., Colosimo A. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 97, N 2. — P. 150–155.

678. Non-invasive exclusion of fetal aneuploidy in an at-risk couple with a balanced translocation / Wang J.Y., Zhen D.K., Zilberstein M.E. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 6, N 2. — P. 103–106.

679. Nonrandom distribution of metaphase AgNOR staining patterns on human acrocentric chromosomes / Heliot L. [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* — 2000. — Vol. 48, N 1. — P. 13–20.

680. Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments / Sadoni N. [et al.] // *J. Cell Biol.* — 1999. — Vol. 146, N 6. — P. 1211–1226.

681. Nucleolar organizer region as a risk factor for Down syndrome / Jackson-Cook C. K., Flannery D., Corey L. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1985. — Vol. 37, N 6. — P. 1049–1061.

682. *O'Neill R.J.W.* Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid / O'Neill R.J.W., O'Neill M.J., Graves J.A.M. // *Nature.* — 1998. — Vol. 393, N 6680. — P. 68–72.

683. *Ogata T.* SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status / Ogata T., Matsuo N., Nishimura G. // *J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 38, N 1. — P. 1–6.

684. *Ogata T.* Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features / Ogata T., Matsuo N. // *Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 95, N 6. — P. 607–629.
685. *Ogawa S.* Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes / Ogawa S. // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, N 5. — P. 1136–1139.
686. *Ohno S.* Female germ cells of man / Ohno S., Makino S., Kaplan W.D., Kinogita R. // *Exp. Cell Res.* — 1961. — Vol. 24. — P. 106–110.
687. *Okamoto E.* Polymorphism of 5-methylcytosine-rich DNA in human acrocentric chromosomes / Okamoto E., Miller D.A., Erlanger B.F., Miller O.G. // *Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 58, N 3. — P. 255–259.
688. *Okano M.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development / Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. // *Cell.* — 1999. — Vol. 99, N 3. — P. 247–257.
689. *Okano M.* Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells / Okano M., Xie S., Li E. // *Nucleic Acids Res.* — 1998. — Vol. 26, N 11. — P. 2536–2340.
690. Organization of a repetitive human 1,8 kb KpnI sequence localized in the heterochromatin of chromosome 15 / Higgins M. [et al.] // *Chromosoma.* — 1985. — Vol. 93, N 1. — P. 77–86.
691. *Orr-Weaver T.* Meiotic nondisjunction does two-step / Orr-Weaver T. // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 14, N 4. — P. 374–375.
692. *Osipova G.R.* PCR detection of Y-specific sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome: clinical implications and limitations / Osipova G.R., Karmanov M.E., Kozlova S.I., Evgrafov O.V. // *Am. J. Med. Genet.* — 1998. — Vol. 76, N 4. — P. 283–287.
693. *Pamphilis M.L.* Review: nuclear structure and DNA replication / Pamphilis M.L. de // *J. Structural Biol.* — 2000. — Vol. 129, N 2–3. — P. 186–197.
694. *Papp Z.* *Obstetrics Genetics* / Papp Z. — Budapest: Akademiai Kiado, 1990. — 627 p.
695. *Paterson W.F.* Poor uterine development in Turner syndrome with oral oestrogen therapy / Paterson W.F., Hollman A.S., Donaldson M.D. // *Clin. Endocrinol.* — 2002. — Vol. 56, N 3. — P. 359–365.
696. *Pathak S.N.M.* Sterility in hybrid cattle. I. Distribution of constitutive heterochromatin and NORs in somatic and meiotic chromosomes / Pathak S., Kieffer N.M. // *Cynogenet. Cell Genet.* — 1979. — Vol. 24, N 1. — P. 42–51.
697. *Patkin E.L.* Noniashvili E.M. DNA-strand breaks in chromosomes of early mouse embryos as detected by in situ nick translation and gap filling / Patkin E.L., Kustova M.E., Noniashvili E.M. // *Genome.* — 1995. — Vol. 38, N 2. — P. 381–384.
698. *Patkin E.L.* Nucleolus organizer regions of chromosomes in early embryogenesis of laboratory mice / Patkin E.L., Sorokin A.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 1983. — Vol. 96, N 8. — P. 92–94.
699. PCR-based detection of mosaicism in Turner syndrome patients / Yorifuji T. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 99, N 1. — P. 62–65.
700. PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome / Coto E. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 1995. — Vol. 57, N 3. — P. 393–396.
701. Peculiarities of late replication of chromosomes of human fetal and chorionic villi cell at 7 and 12 weeks of gestation / Vorobyeva A.V. [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 10, N 1. — P. 157.
702. *Pederson T.* The spatial organization of the genome in mammalian cells / Pederson T. // *Curr. Options Genet. Develop.* — 2004. — Vol. 14, N 2. — P. 203–209.
703. *Pellestor F.* Direct assesment of the rate of chromosomal abnormalities in grade IV

human embryos produced by in-vitro fertilization procedure / Pellestor F., Dufour M.C., Arnal F., Humeau C. // Hum. Reprod. — 1994. — Vol. 9, N 2. — P. 293–302.

704. *Pellestor F.* The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos / Pellestor F. // Hum. Reprod. Update. — 1995. — Vol. 1, N 6. — P. 581–585.

705. *Pendina A.* NOR activity of a bisatellited additional chromosome in karyotype of patient with the feature of Turner phenotype / Pendina A., Chiryayeva O., Kuznetzova T. // Eur. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 9, N 1. — P. 144.

706. *Pennisi E.* Cell division gatekeepers identified / Pennisi E. // Science. — 1998. — Vol. 279, N 5348. — P. 176–177.

707. Percutaneous umbilical blood sampling. A new technique for prenatal diagnosis / Ludomirsky A. [et al.] // J. Reprod. Med. — 1987. — Vol. 32, N 12. — P. 276–279.

708. *Peters H.* The ovary / Peters H., McNatty K.P. — Berkeley: Univ. California Press, 1980. — 123 p.

709. *Pfeifer G.P.* Formation and repair of DNA lesions in the p53 gene: relation to cancer mutations / Pfeifer G.P., Denissenko M.F. // Environ. Mol. Mutagen. — 1998. — Vol. 31, N 3. — P. 197–205.

710. *Pfeifer K.* Mechanisms of genomic imprinting / Pfeifer K. // Am. J. Hum. Genet. — 2000. — Vol. 67, N 4. — P. 777–787.

711. Phenotype, ovarian function, and growth in patients with 45,X/47,XXX Turner mosaicism: implications for prenatal counseling and estrogen therapy at puberty / Blair J. [et al.] // J. Pediatr. — 2001. — Vol. 139, N 5. — P. 724–728.

712. *Pimpinelli S.* On biological functions mapping to the heterochromatin of *Drosophila melanogaster* / Pimpinelli S., Sullivan W., Prout M., Sandler L. // Genetics. — 1985. — Vol. 109, N 4. — P. 701–724.

713. *Pinkel D.* Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitive, fluorescence hybridization / Pinkel D., Straume T., Gray J.W. // PNAS. — 1986. — Vol. 83, N 9. — P. 2138–2142.

714. Placental mosaicism is associated with unexplained second-trimester elevation of MShCG levels, but not with elevation of MSAFP levels / Morssink L.P., Sikkema-raddatz B., Beekhuis J.R. [et al.] // Prenat. Diagn. — 1996. — Vol. 16, N 9. — P. 845–851.

715. Polar body diagnosis of common aneuploidy by FISH / Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. — 1996. — Vol. 13, N 2. — P. 157–162.

716. Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in man / Qureshi S. [et al.] // Mol. Hum. Reprod. — 1996. — Vol. 2, N 10. — P. 775–779.

717. Polymerase chain reaction products containing 5-methylcytidine. A microplate immunoquantification method / Niveleau A.C. [et al.] // Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22, N 24. — P. 5508–5509.

718. Polymorphism in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome / Hobbs C., Sherman S., Yi P. [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2000. — Vol. 67, N 3. — P. 623–630.

719. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos / Munne S. [et al.] // Hum. Reprod. — 1999. — Vol. 14, N 9. — P. 2191–2199.

720. *Predanic M.* Fetal aneuploidy and umbilical cord thickness measured between 14 and 23 weeks' gestational age / Predanic M., Perni S.C., Chasen S., Chervenak F.A. // J. Ultrasound Med. — 2004. — Vol. 23, N 9. — P. 1177–1183.

721. *Preece M.* Genomic imprinting, uniparental disomy and foetal growth / Preece M., Moore G.E. // Trends in endocrinology and metabolism. — 2000. — Vol. 11, N 7. — P. 270–275.

722. Pregnancy after hormonal correction of severe spermatogenic defect due to mutation in androgen receptor gene / Yong E.L., Ng S.C., Roy A.C. [et al.] // Lancet. — 1994. — Vol. 344, N 8925. — P. 826–827.

723. Pregnancy in patients with Turner's syndrome: six new cases and review of literature / Tarani L. [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* — 1998. — Vol. 12, N 2. — P. 83–87.
724. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching / Verlinsky Y., Rechitsky S., Schoolcraft W. [et al.] // *JAMA.* — 2001. — Vol. 285, N 24. — P. 3130–3133.
725. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by first- and second-polar body FISH analysis / Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 1998. — Vol. 15, N 5. — P. 285–289.
726. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities from chorionic biopsy samples: improved success rate using a modified direct method / Metaxotani A. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1987. — Vol. 7, N 9. — P. 461–470.
727. Prenatal diagnosis of chromosomal disorders in North-West Russia / Kuznetzova T. [et al.] // *BJMG.* — 1998. — Vol. 1, N 1. — P. 21–28.
728. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma / Lo Y.M., Hjelm N.M., Fidler C. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 339, N 24. — P. 1734–1748.
729. Prenatal diagnosis of uniparental disomy 15 following trisomy 15 mosaicism / Christian S.L. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1996. — Vol. 16, N 4. — P. 323–332.
730. Prevalence of Y chromosome microdeletion in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection / Oliva R. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1998. — Vol. 70, N 3. — P. 506–510.
731. Proliferative activity in ectopic trophoblastic tissue / Kleim M. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 9. — P. 2441–2444.
732. Pujol R. X-ray — induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase in female fetuses of *Rattus norvegicus* / Pujol R., Cusido L. // *Mutat. Res.* — 1997. — Vol. 379, N 2. — P. 127–134.
733. Qumsiyeh M.B. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi / Qumsiyeh M.B., Kim K.R., Ahmed M.N., Bradford W. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 2000. — Vol. 88, N 3–4. — P. 230–235.
734. Raabe G. Cell proliferation in chorionic villi at different gestational ages as analysed by premature chromosome condensation / Raabe G., Miller K. // *Cytogenet. Cell. Genet.* — 1990. — Vol. 54, N 3–4. — P. 127–131.
735. Radiation-induced chromosome aberrations in guinea-pig growing oocytes, and their relation to follicular atresia / Jacquet P. [et al.] // *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* — 2001. — Vol. 473, N 2. — P. 249–254.
736. Ramsey P.A. Amniocentesis / Ramsey P.A., Fisk N.M. // *High risk pregnancy* / Eds. D.K. James [et al.]. — London: WB Saunders Co. Ltd, 1996. — P. 735–744.
737. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa / Yurov Y.B. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 2, N 9. — P. 665–668.
738. Rapid karyotyping for prenatal diagnosis in the second and third trimester of pregnancy / Basaran S. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 4. — P. 315–320.
739. Rapid karyotyping in prenatal diagnosis: a comparative study of the 'pipette method' and the 'in situ' technique for chromosome harvesting // *Prenat. Diagn.* — 1993. — Vol. 13, N 12. — P. 1085–1093.
740. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hybridization / Christensen B. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1992. — Vol. 12, N 4. — P. 241–250.
741. Rappold G.A. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes / Rappold G.A. // *Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 92, N 4. — P. 315–324.
742. Rare non-mosaic trisomies in chorionic villus tissues not confirmed at amniocentesis /

Dorfmann A.D. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1992. — Vol. 12, N 11. — P. 899–902.

743. Rare trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes, involving an autosome other than chromosomes 13, 18, 20, and 21: karyotype/phenotype correlations / Hsu L.Y., Yu M.T., Neu R.L. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1997. — Vol. 17, N 3. — P. 201–242.

744. *Razin A.* CpG methylation, chromatin structure and gene silencing — a three-way connection / *Razin A.* // *EMBO J.* — 1998. — Vol. 17, N 17. — P. 4905–4908.

745. *Razin A.* DNA methylation and gene expression / *Razin A., Cedar H.* // *Microbiol. Rev.* — 1991. — Vol. 55, N 3. — P. 451–458.

746. *Razin A.* DNA methylation in early development / *Razin A., Shemer R.* // *Hum. Mol. Genet.* — 1995. — Vol. 4. — P. 1751–1755.

747. *Razin A.* DNA methylation / *Razin A., Kafri T.* // *Progress in nucleic acids research.* — N.-Y.: Springer-Verlag, 1994. — P. 55–81.

748. *Reader R.* Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants / *Reader R.* // *J. Cell Biol.* — 1985. — Vol. 101, N 5, Pt. 1. — P. 2013–2016.

749. Recommendations and protocols for prenatal diagnosis / Eds. J.M. Carrera, G.C. Di Renzo — Barcelona: Salvat Editores, 1993. — 52 p.

750. Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin / *Strohner R.* [et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 24, N 4. — P. 1791–1788.

751. Recurrent Down's syndrome due to maternal ovarian trisomy 21 mosaicism / *Tsong L.-H.* [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* — 1994. — Vol. 255. — P. 213–216.

752. *Reddy K.S.* Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism / *Reddy K.S., Sulcova V.* // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1998. — Vol. 82, N 1–2. — P. 52–57.

753. Reduction recombination and paternal effect in Klinefelter syndrome / *Lorda-Sanceez I.* [et al.] // *Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 89, N 5. — P. 524–530.

754. Regulation of human placental development by oxygen tension / *Genbacev O.* [et al.] // *Science.* — 1997. — Vol. 277, N 5332. — P. 1669–1672.

755. Regulatory elements in the minimal promoter region of the mouse *Xist* gene / *Sheardown S.A., Newall A.E., Norris D.P.* [et al.] // *Gene.* — 1997. — Vol. 203, N 2. — P. 159–168.

756. Reliability of polymerase chain reaction (PCR) analysis of single cells for preimplantation genetic diagnosis / *Strom C.M.* [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 1994. — Vol. 11, N 2. — P. 55–62.

757. Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells / *Hatton K.S., Dhar V., Brown E.H.* [et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 1988. — Vol. 8, N 5. — P. 2149–2158.

758. Replication timing of DNA sequences associated with human centromeres and telomeres / *Hagen K.G.T.* [et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 1990. — Vol. 10, N 12. — P. 6348–6355.

759. Replication timing of genes and middle repetitive sequences / *Goldman M.A.* [et al.] // *Science.* — 1984. — Vol. 224, N 4650. — P. 686–692.

760. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos / *Peaston A.E.* [et al.] // *Developmental Cell.* — 2004. — Vol. 7, N 4. — P. 597–606.

761. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 / *Amir R.E.* [et al.] // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23, N 2. — P. 185–188.

762. *Richler C.* X inactivation in mammalian testis is correlated with inactive X specific transcription / *Richler C., Soreg E., Wahrman J.* // *Nat. Genet.* — 1992. — Vol. 2, N 3. — P. 192–195.

763. *Rieder C.* The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis / *Rieder C., Salmon E.D.* // *Trends Cell Biol.* — 1998. — Vol. 8, N 8. — P. 310–318.

764. Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling / *Phillips O.P.* [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1996. — Vol. 174, N 3. — P. 850–855.

765. *Roberts E.* Maternal cell contamination in chorion villus samples assessed by direct preparations and three different culture methods / Roberts E., Duckett D., Lang G. // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 9. — P. 635–640.

766. *Robinson W.P.* The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy / Robinson W.P., McFadden D.E., Stephenson M.D. // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 69, N 6. — P. 1245–1254.

767. *Rogan P.K.* Maternal uniparental disomy of chromosome 21 in a normal child / Rogan P.K., Sabol D.W., Punnett H.H. // *Am. J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 83, N 1. — P. 69–71.

768. Role of human ribosomal RNA (rRNA) promoter methylation and of methyl-CpG-binding protein MBD2 in the suppression of rRNA gene expression / Ghoshal K., Majumder S., Datta J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279, N 8. — P. 6783–6793.

769. *Roussel P.* Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity / Roussel P., Hernandez-Verdun D. // *Exp. Cell Res.* — 1994. — Vol. 214, N 2. — P. 465–472.

770. *Rudak E.* Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa / Rudak E., Jacobs P.A., Yanagimachi R. // *Nature.* — 1978. — Vol. 274, N 5674. — P. 911–913.

771. *Rustico M.A.* Nasal bone and trisomy 21: prenatal ultrasound and postmortem morphohistological study / Rustico M.A., Bussani R., Silvestri F. // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2004. — Vol. 23, N 1. — P. 96–97.

772. *Saccone S.* Human chromosomal banding by in situ hybridization of isochors / Saccone S., Bernardi G. // *Methods in Cell Science.* — 2001. — Vol. 23, N 1–3. — P. 7–15.

773. *Saenger P.* Turner's syndrome / Saenger P. // *N. Engl. J. Med.* — 1996. — Vol. 335, N 23. — P. 1749–1754.

774. *Saks E.* Confined placental mosaicism for trisomy 8 and intra-uterine growth retardation / Saks E., McCoy M.C., Damron J., Kelly T.E. // *Prenat. Diagn.* — 1998. — Vol. 18, N 11. — P. 1202–1204.

775. *Santoro R.* Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription / Santoro R. // *Mol. Cell.* — 2001. — Vol. 8, N 3. — P. 719–725.

776. Satellite DNA hypomethylation vs overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential / Qu G.Z. [et al.] // *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagens.* — 1999. — Vol. 423, N 1–2. — P. 91–101.

777. *Savage J.R.* The disparity between homologous chromosomes during DNA replication / Savage J.R.K., Cawood A.H., Papworth D.G. // *J. Theor. Biol.* — 1983. — Vol. 100, N 4. — P. 631–643.

778. *Schmidt M.* Evidence for relationship between DNA methylation and DNA replication from studies of 5-azacytidine-reactivated allocyclic X-chromosome / Schmidt M., Wolf S., Migeon B. // *Exp. Cell Res.* — 1985. — Vol. 158, N2. — P. 301–310.

779. *Schramke V.* Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin / Schramke V., Allshire R. // *Curr. Options Genet. Develop.* — 2004. — Vol. 14, N 2. — P. 74–80.

780. *Schwack M.* Turner's syndrome (monosomy) and pregnancy / Schwack M., Schindler A.E. // *Zentralbl. Gynakol.* — 2000. — Vol. 122, N 2. — P. 103–105.

781. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men included in an in-vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program / Aran B. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1999. — Vol. 72, N 4. — P. 696–701.

782. Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection / Krausz C. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, N 7. — P. 1717–1721.

783. Segmental trisomy of chromosome 17: a mouse model of human aneuploidy syndromes / Vacik T., Ort M., Gregorova S. [et al.] // *PNAS.* — 2005. — Vol. 102, N 12. — P. 4500–4505.

784. Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies / Navarro J. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 53, N 1. — P. 214–219.

785. *Shepard Th.H.* Catalog of Teratogenic Agents / Shepard Th.H. // 9-th ed. — London: Hopkins Univ. Press, 1998. — 593 p.

786. Short-limb dwarfism and hypertrophic cardiomyopathy in a patient with paternal isodisomy 14: 45,XY, idic(14)(p11) / Walter C.A. [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 1996. — Vol. 65, N 4. — P. 259–265.

787. *Sifakis S.* Ultrasonographic markers in chromosomal abnormalities / Sifakis S. // *BJMG.* — 2003. — Vol. 6, N 3–4. — P. 31–40.

788. Significance of genetic testing for paternal uniparental disomy of chromosome 6 in neonatal diabetes mellitus / Christian S.L. [et al.] // *J. Pediatr.* — 1999. — Vol. 134, N 1. — P. 9–10.

789. *Simoni G.* Confined placental mosaicism / Simoni G., Sirchia S.M. // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14, N 13. — P. 1185–1189.

790. *Simoni G.* Fetal karyotyping by direct chromosome preparation / Simoni G., Tetzoli G., Romotti L. // *Chorion villi sampling.* — N.-Y., Basel: Marcel Dekker Inc., 1986. — P. 99–118.

791. Simultaneous detection of X- and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization / Han T.L. [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* — 1993. — Vol. 34, N 3. — P. 308–313.

792. *Singal R.* DNA methylation / Singal R., Ginder G.D. // *Blood.* — 1999. — Vol. 93, N 12. — P. 4059–4070.

793. *Skibbens R.V.* Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery / Skibbens R.V., Hieter P. // *Ann. Rev. Genet.* — 1998. — Vol. 32. — P. 307–337.

794. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men / Rubes J. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1998. — Vol. 70, N 4. — P. 715–723.

795. *Soares J.* Global DNA hypomethylation in breast carcinoma — correlation with prognostic factors and tumor progression / Soares J., Pinto A.E., Cunha C.V. // *Cancer.* — 1999. — Vol. 85, N 1. — P. 112–118.

796. *Solari A.J.* Synaptonemal complex analysis in human male infertility / Solari A.J. // *Eur. J. Histochem.* — 1999. — Vol. 43, N 4. — P. 265–276.

797. *Solari A.J.* Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes / Solari A.J. // *Chromosoma.* — 1980. — Vol. 81, N 3. — P. 315–337.

798. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation / Hollstein M. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — Vol. 24, N 1. — P. 141–146.

799. Sonographic morphology and hyaluronan content of umbilical cords of healthy and Down syndrome fetuses in early gestation / Raio L., Ghezzi F., Cromi A. [et al.] // *Early Hum. Dev.* — 2004. — Vol. 77, N 1–2. — P. 1–12.

800. *Sorger P.K.* Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics / Sorger P.K., Dobles M., Tournnebize R., Anthony A. // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 9, N 6. — P. 807–814.

801. *Speed R.M.* Meiosis in mammals / Speed R.M. // *Advances in mutagenesis research-1.* — Basel: Springer-Verlag, 1990. — P. 27–69.

802. *Speed R.M.* The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes / Speed R.M. // *Hum. Genet.* — 1988. — Vol. 78, N 3. — P. 260–266.

803. *Speed R.M.* The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy / Speed R.M. // *Hum. Genet.* — 1985. — Vol. 69, N 1. — P. 69–75.

804. *Sperling K.* Exogenous and endogenous risk factor for maternal non-disjunction of chromosome 21 / Sperling K., Pelz J. // *BJMG.* — 2003. — Vol. 6, N 3–4. — P. 5–14.

805. *Sperling K.* Meiotic studies of the ejaculated seminal fluid of humans with normal sperm count and oligospermia / Sperling K., Kaden R. // *Nature*. — 1971. — Vol. 232, N 5311. — P. 481.

806. *Sperling K.* Significant increase in trisomy 21 in Berlin nine after the Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation? Sperling K., Pelz J., Wegner R.D. // *Br. Med. J.* — 1994. — Vol. 309, N 6948. — P. 158–162.

807. *Sperling K.* Transcriptional activity of constitutive heterochromatin in the mammal *Microtus agrestis* (Rodentia, Cricetidae) / Sperling K., Kalscheuer V., Neitzel H. // *Exp. Cell Res.* — 1987. — Vol. 173, N 2. — P. 463–472.

808. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization / Kruger T.F. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1986. — Vol. 46, N 6. — P. 1118–1123.

809. Sperm nuclear matrix association of the PRM1→PRM2→TNP2 domain is independent of Alu methylation / Schmid C., Heng H.H., Rubin C. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 7, N 10. — P. 903–911.

810. *Spiggs E.L.* Aneuploidy in human sperm: use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction / Spiggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.T. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58, N 2. — P. 356–362.

811. Spontaneous pubertal development in Turners syndrome / Pasquino A. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1997. — Vol. 82, N 6. — P. 1810–1813.

812. *Spriggs E.L.* Aneuploidy in human sperm: result of two-and three-colour fluorescence in situ hybridisation using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X and Y / Spriggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.H. // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1995. — Vol. 71, N 1. — P. 47–53.

813. *Stancheva I.* Chromatin structure and methylation of rat rRNA genes studied by formaldehyde fixation and psoralen cross-linking / Stancheva I., Lucchini R., Koller T., Sogo J.M. // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25, N 9. — P. 1727–1735.

814. *Steele M.W.* Chromosome analysis of human amniotic fluid cells / Steele M.W., Breg W.R. // *Lancet*. — 1966. — Vol. 1, N 7434. — P. 383–385.

815. *Stoll C.* Study of Down syndrome in 238,942 consecutive births / Stoll C., Alembik Y., Dott B., Roth M.P. // *Ann Genet.* — 1998. — Vol. 41, N 1. — P. 44–51.

816. *Stranc L.C.* Prenatal diagnosis in Canada — 1990: a review / Stranc L.C., Evans J.A., Hamerton J.L. // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14, N 13. — P. 1253–1265.

817. Studies of DNA methylation in animals / Bird A., Tate P., Nan X. [et al.] // *J. Cell Science.* — 1995. — Vol. 19. — P. 37–39.

818. Study of stringency conditions for human papillomavirus DNA detection on cell lines frozen and paraffinembedded tissue sections by in situ hybridization with biotinylated probes / Guerin-Reverchon I. [et al.] // *Histochemistry.* — 1990. — Vol. 93, N 6. — P. 627–634.

819. *Sumner A.T.* New technique for distinguishing between human chromosomes / Sumner A.T., Tvars H.J., Buckland R.A. // *Nature*. — 1971. — Vol. 232. — P. 31–32.

820. *Sumner A.T.* The distribution of genes on chromosomes: a cytological approach / Sumner A.T., de la Torre J., Stuppia L. // *J. Mol. Evol.* — 1993. — Vol. 37, N 2. — P. 117–122.

821. *Sung W.K.* A method for obtaining synaptonemal complexes of human pachytene oocytes / Sung W.K., Komatsu M., Jagiello G. // *Caryologia.* — 1984. — Vol. 36. — P. 315–324.

822. *Surani A.* Development of reconstituted mouse eggs suggestd imprinting of the genome during gametogenesis / Surani A., Barton S.C., Norris M.L. // *Nature*. — 1984. — Vol. 308, N 5959. — P. 548–550.

823. Susceptible chiasmate configuration of chromosome 21 predispose to nondisjunction in both maternal meiosis I and meiosis II / Lamb N. [et al.] // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 14, N 4. — P. 400–405.

824. SuUR protein binds to boundary regions separating forum domains / Tchurikov N.A. [et al.] // *J. Biol. Chemistry.* — 2004. — Vol. 279, N 12. — P. 11705–11710.

825. *Taga M.* Two pregnancies in 45,X/46,X,r(X)/46,XX Turner mosaic patient. A case report / *Taga M., Minaguchi H., Saotome K.* // *Gynecol. Obstet. Invest.* — 1996. — Vol. 42, N 3. — P. 206–208.
826. *Takanari H.* Dense bodies in silver-stained spermatocytes of the chinese hamster: behavior and cytochemical nature / *Takanari H., Pathak B., Hsu T.C.* // *Chromosoma.* — 1982. — Vol. 86, N 3. — P. 359–373.
827. *Tarkowski A.K.* An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs / *Tarkowski A.K.* // *Cytogenetics.* — 1966. — Vol. 5. — P. 394–400.
828. *Tate P.* The methyl-CpG-binding protein MeCP2 is essential development in the mouse / *Tate P., Skarnes W., Bird A.* // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 12, N 2. — P. 205–208.
829. *Tate P.H.* Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression / *Tate P.H., Bird A.P.* // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 1993. — Vol. 3, N 2. — P. 226–231.
830. *Taylor E.F.* Familial silver staining patterns of human nucleolability of organizer regions (NORs) / *Taylor E.F., Martin-De Leon P.A.* // *Amer. J. Hum. Genet.* — 1981. — Vol. 33, N 1. — P. 67–76.
831. *Taylor J.H.* Origins of replication and gene regulation / *Taylor J.H.* // *Mol. Cell Biochem.* — 1984. — Vol. 61, N 2. — P. 99–109.
832. *Tedde G.* Mitotic index of the Langhans cells in the normal human placenta from the early stages of pregnancy to the term / *Tedde G., Tedde P.* // *Acta Anat.* — 1978. — Vol. 100, N 1. — P. 114–119.
833. *Templado C.* Improved technique for study of meiosis in ejaculate: results of the 50 consecutive cases / *Templado C., Vidal F., Navarro J., Egozcue J.* // *Hum. Genet.* — 1986. — Vol. 72, N 3. — P. 275–277.
834. *Tesarik J.* Involvement of oocyte-coded messages in cell differentiation control in early mammalian development: a comparison of several species / *Tesarik J.* // *Mol. Reprod. Dev.* — 1989. — Vol. 28. — P. 319–324.
835. *Tetzoli G.I.* Chorionic villi sampling: improved method for preparation of karyotypes after short term incubation / *Tetzoli G.I., Lalatta F., Gilbert F.* // *Prenat. Diagn.* — 1987. — Vol. 7, N 6. — P. 389–394.
836. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors / *Gama-Sosa M.A.* [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1983. — Vol. 11, N 19. — P. 6883–6894.
837. The distribution of genes in the human genome / *Mouchiroud D.* [et al.] // *Gene.* — 1991. — Vol. 100. — P. 181–187.
838. The genetic control of meiosis / *Baker B.S.* [et al.] // *Ann. Rev. Genet.* — 1976. — Vol. 78. — P. 286–288.
839. The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions / *Vollrath D.* [et al.] // *Science.* — 1992. — Vol. 258, N 5079. — P. 52–59.
840. The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region / *Foote S.* [et al.] // *Science.* — 1992. — Vol. 258, N 5079. — P. 60–66.
841. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes / *Bianchi M.S.* [et al.] // *Chromosoma.* — 1985. — Vol. 91, N 2. — P. 131–136.
842. The mosaic genome of warm-blooded vertebrates / *Bernardi G.* [et al.] // *Science.* — 1985. — Vol. 228, N 4702. — P. 953–958.
843. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse / *Brandeis M.* [et al.] // *EMBO J.* — 1993. — Vol. 12, N 9. — P. 3669–3677.
844. The outcome of pregnancies with confined placental mosaicism in cytotrophoblast cells / *Leschot N.J.* [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1996. — Vol. 16, N 8. — P. 705–712.
845. The parental origin of the missing or additional chromosome in 45,X and 47,XXX females / *Hassold T.* [et al.] // *Birth. Defects. Orig. Artic. Ser.* — 1990. — Vol. 26, N 4. — P. 297–304.
846. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs

and absent in inactive NORs / Roussel P. [et al.] // *J. Cell Biol.* — 1996. — Vol. 133, N 2. — P. 235–246.

847. The silver-stained NOR and argentophilic nuclear proteins in early mouse embryogenesis: a cytological study / Dyban A.P. [et al.] // *Cell Differentiation and Development.* — 1990. — Vol. 29, N 3. — P. 165–179.

848. The use of early simultaneous percutaneous umbilical blood sampling (PUBS) and amniocentesis for prenatal Fragile X chromosome diagnosis / Butler M. [et al.] // *Amer. J. Med. Genet.* — 1988. — Vol. 31, N 4. — P. 775–778.

849. *Tice R.* The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics / Tice R., Schneider E.L., Rary J.M. // *Exp. Cell Res.* — 1976. — Vol. 102, N 2. — P. 232–236.

850. *Tiepolo L.* Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm / Tiepolo L., Zuffardi O. // *Hum. Genet.* — 1976. — Vol. 34, N 2. — P. 119–124.

851. *Torre J.* The distribution of genes on human chromosomes as studied by in situ nick translation / de la Torre J., Sumner A.T., Gosalvez J., Stuppia L. // *Genome.* — 1992. — Vol. 35, N 5. — P. 890–894.

852. *Torres M.L.* The study of human male meiosis. II. Q-banding in pachytene bivalents / de Torres M.L. de, Abrisqueta Y.A. // *Hum. Genet.* — 1978. — Vol. 42, N 3. — P. 283–293.

853. *Touraine J.L.* Perinatal fetal-cell and gene therapy / Touraine J.L. // *Int. J. Immunopharmacol.* — 2000. — Vol. 22, N 12. — P. 1033–1140.

854. Transabdominal chorionic villus sampling: analysis of 350 consecutive cases / Bovichelli L. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1988. — Vol. 8, N 7. — P. 495–500.

855. Transabdominal villus sampling in early second trimester: a safe sampling method for women of advanced age / Jahoda M.G.J. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 1990. — Vol. 10, N 5. — P. 307–311.

856. Triploidy after in vitro fertilization: Cytogenetic analysis of human zygotes and embryos / Pieters M.H. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 1992. — Vol. 9, N 1. — P. 68–76.

857. *Trzepizur K.* A survey of satellite association formation by acrocentric chromosomes depending on their Ag-NOR class / Trzepizur K., Hubner H., Trzepizur Z. // *J. Appl. Genet.* — 1995. — Vol. 36, N 1. — P. 69–80.

858. Twin pregnancy after oocyte donation in a woman with Turner syndrome / Gutierrez A. [et al.] // *Ginecol. Obstet. Mex.* — 1994. — Vol. 62. — P. 182–184.

859. Two cases of confined placental mosaicism for chromosome 4, including one with maternal uniparental disomy / Kuchinka B.D. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2001. — Vol. 21, N 1. — P. 36–39.

860. Two male patients with ring Y: definitions of an interval in Yq contributing to Turner syndrome / Tzancheva M. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 36, N 7. — P. 549–553.

861. *Tycko B.* Epigenetic gene silencing in cancer / Tycko B. // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 105, N 4. — P. 401–407.

862. Ultrasound evaluation of fetal nasal bone at 11 to 14 weeks in a consecutive series of 1906 fetuses / Viora E., Masturzo B., Errante G. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2003. — Vol. 23, N 10. — P. 784–787.

863. Uniparental disomy in fetuses diagnosed with balanced Robertsonian translocations: risk estimate / Silverstein S., Lerer I., Sagi M. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2002. — Vol. 22, N 8. — P. 649–651.

864. *Van Hummelen P.* Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization / Van Hummelen P., Lowe X.R., Wyrobek A.J. // *Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 98, N 5. — P. 608–615.

865. *Van Ommen G.J.B.* The Human Genome Project and the future of diagnostics,

treatment and prevention / Van Ommen G.J.B., Bakker E., den Dunnen J.T. // *Lancet*. — 1999. — Vol. 354, N 1. — P. 5–10.

866. Variability of human rRNA genes: inheritance and nonrandom chromosomal distribution of structural variants of nontranscribed spacer sequences / Garcavtsev I.V. [et al.] // *Hum. Genet.* — 1988. — Vol. 81, N 1. — P. 31–37.

867. *Vekmans M.J.J.* Cytogenetic analysis of chorionic villi: a technical assessment / Vekmans M.J.J., Perry T.B. // *Hum. Genet.* — 1986. — Vol. 72, N 4. — P. 307–310.

868. *Velissariou V.* Uniparental disomy (UPD): a consequence of non-disjunction and the implications in prenatal diagnosis / Velissariou V. // *BJMG*. — 2003. — Vol. 6, N 3–4. — P. 55–59.

869. *Venter J.C.* The sequence of the human genome / Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. // *Science*. — 2001. — Vol. 291, N 5507. — P. 1304–50.

870. *Vereslev L.O.* European Collaborative Research on mosaicism in CVS / Vereslev L.O. // *EUCROMIC Newsletter*. — 1994. — Vol. 1. — P. 3.

871. *Verlinsky Y.* An atlas of Preimplantation genetic diagnosis / Verlinsky Y., Kuliev A. — N.-Y.: Pearl River, Parthenon, 2000. — 174 p.

872. *Verlinsky Y.* Karyotyping of human oocytes by chromosomal analysis of the second polar bodies / Verlinsky Y., Evsikov S. // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 5, N 2. — P. 89–95

873. *Verlinsky Y.* Preimplantation diagnosis of genetic diseases: a new technique in assisted reproduction / Verlinsky Y., Kuliev A.M. — N.-Y.: Wiley-Liss, 1993. — 155 p.

874. *Verlinsky Y.* Visualisation and cytogenetic analysis of second polar body chromosomes following its fusion with a one-cell mouse embryo / Verlinsky Y., Dozortsev D., Evsikov S. // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 1994. — Vol. 11, N 3. — P. 123–131.

875. *Verma R.S., Babu A.* Human Chromosomes: Manual of Basic Techniques / Verma R.S., Babu A. — N.-Y.: Pergamon Press. Inc., 1989. — 240 p.

876. *Vissel B.* Mouse major (gamma) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between nonhomologous chromosomes / Vissel B., Choo K.H. // *Genomics*. — 1989. — Vol. 5, N 3. — P. 407–414.

877. Visualization of R-bands in human metaphase chromosomes by the the restriction endonuclease *Mse I* / Ludena P., Sentsis C., De Cabo S.F. [et al.] // *Cytogenet. Cell. Genet.* — 1991. — Vol. 57, N 2–3. — P. 82–87.

878. *Vogt P.* Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved chromatin folding code / Vogt P. // *Hum. Genet.* — 1990. — Vol. 84, N 4. — P. 301–336.

879. *Vore G.R.* The association between an abnormal nuchal skin fold, trisomy 21. And ultrasound abnormalities identified during the second trimester of pregnancy / de Vore G.R., Alfí O. // *Ultrasound Obstetr. Gynecol.* — 1993. — Vol. 3, N 6. — P. 387–394.

880. *Vorsanova S.C.* Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: application of multicolor fluorescence hybridization and original DNA probes for chromosomes 1, 9, 13, 14, 16, 21, 22, X and Y / Vorsanova S.C., Kirilova E.A., Yurov Y.B. // *BJMG*. — 2003. — Vol. 6, N 3–4. — P. 49–54.

881. *Wallace D.* Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism / Wallace D. // *J. Bioenergy Biomembranes*. — 1994. — Vol. 26, N 3. — P. 241–250.

882. *Wallace B.M.N.* Triple chromosome synapsis in oocytes from a human foetus with trisomy 21 / Wallace B.M.N., Hulten M.A. // *Ann. Rev. Genet.* — 1983. — Vol. 47, N 4. — P. 271–276.

883. *Walsh C.P.* Cytosine methylation and mammalian development / Walsh C.P., Bestor T.H. // *Genes Dev.* — 1999. — Vol. 13, N 1. — P. 26–34.

884. *Warburton D.* Genetic factors influencing aneuploidy frequency / Warburton D. // *Aneuploidy — Etiology and mechanism* / Eds. V.L. Dellarco, P.E. Voytek, A. Hollander — N.-Y.: Plenum Press, 1985. — P. 133–148.

885. Warburton D. Mosaic autosomal trisomy in cultures from spontaneous abortions / Warburton D., Yu C.Y., Kline J., Stein Z. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1978. — Vol. 30, N 6. — P. 609–617.

886. Watson A.L. Human chorionic gonadotropin release and tissue viability in placental organ culture / Watson A.L., Palmer M.E., Burton G. // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 8. — P. 2159–2164.

887. Wegner R.D. Chorionic villi analysis / Wegner R.D. // *Advances in mutagenesis research-4.* — Basel: Springer-Verlag, 1993. — P. 204–235.

888. Werner W. Cytogenetic studies of a family with trisomy 21 mosaicism in two successive generations as the cause of Down's syndrome / Werner W., Herrmann F.H., John B. // *Hum. Genet.* — 1982. — Vol. 60, N 2. — P. 202–204.

889. Westergaard M. The synaptonemal complex / Westergaard M., Von Wettstein D. // *Ann. Rev. Genet.* — 1972. — Vol. 6. — P. 71–110.

890. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. — Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2000. — 139 p.

891. Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBMI and DAZ genes / Stuppia L. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 59, N 6. — P. 1393–1395.

892. Wilkins-Haug L. Confined placental mosaicism and intrauterine growth retardation: a case-control analysis of placentas at delivery / Wilkins-Haug L., Roberts D.J., Morton C.C. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1995. — Vol. 172, N 1, Pt. 1. — P. 44–50.

893. Wilson G.N. Genomic imprinting: summary of an NICHD Conference / Wilson G.N., Hall J.G., De la Cruz F. // *Am. J. Med. Genet.* — 1993. — Vol. 46, N 6. — P. 675–680.

894. Winter R.M. Analysing human developmental abnormalities / Winter R.M. // *Bioassays.* — 1996. — Vol. 18, N 12. — P. 965–971.

895. Wolgemuth D.J. Genetic control of mitosis, meiosis and cellular differentiation during mammalian spermatogenesis / Wolgemuth D.J., Rhee K., Ravnik S.E. // *Reprod. Fertil. Dev.* — 1995. — Vol. 7, N 4. — P. 669–689.

896. Wolstenholme J. Confined placental mosaicism, IYGR, and adverse pregnancy outcome: a controlled retrospective U.K. collaborative survey / Wolstenholme J., Rooney D.E., Davison E.V. // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14, N 5. — P. 345–361.

897. Wramsby H. Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles / Wramsby H., Fredga K., Lienholm P. // *N. Engl. J. Med.* — 1987. — Vol. 316, N 3. — P. 121–124.

898. X;Y translocation in a girl with a short stature and some features of Turner's syndrome: cytogenetic and molecular studies / Kuznetzova T. [et al.] // *J. Med. Genet.* — 1994. — Vol. 31, N 8. — P. 699–651.

899. Xodo L.E. Effect of 5-methylcytosine on the structure and stability of DNA. Formation of triple-stranded concatenamers by overlapping oligonucleotides / Xodo L.E., Alunni-Fabbroni M., Manzini G. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 1994. — Vol. 11, N 4. — P. 703–720.

900. Yamada K. Population studies of inv(9) chromosomes in 4,300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance / Yamada K. // *Jpn. J. Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 37, N 4. — P. 293–301.

901. Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism / Mendes J.R., Strufaldi M.W., Delcelo R. [et al.] // *Clin. Endocrinol.* — 1999. — Vol. 50, N 1. — P. 19–26.

902. Young L.E. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep / Young L.E., Beaujean N. // *Animal reproduction science.* — 2004. — Vol. 82–83. — P. 61–78.

903. *Zahed L.* Cell cycle studies in chorionic villi / Zahed L., Murer-Orlando M., Bobrow M. // *Hum. Genet.* — 1988. — Vol. 80, N 2. — P. 127–134.

904. *Zankl H.* Satellite associations and NOR staining in mitoses of trisomy 21 mosaicism / Zankl H., Nagl H. // *Hum. Genet.* — 1980. — Vol. 55, N 1. — P. 115–117.

905. *Zenzes M.T.* Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization / Zenzes M.T., Casper R.F. // *Hum. Genet.* — 1992. — Vol. 88, N 4. — P. 367–375.

906. *Zhang L.* Early detection of apoptosis in defined lymphocyte populations in vivo / Zhang L., Wang C., Radvanyi L.G., Miller R.G. // *J. Immunol. Methods.* — 1995. — Vol. 181, N 1. — P. 17–27.

907. *Zoubak S.* The gene distribution of the human genome / Zoubak S., Clay O., Bernardi G. // *Gene.* — 1996. — Vol. 174, N 1. — P. 95–102.

908. *Zurita F.* Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between r-DNA levels and the expression of the homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for structure and function / Zurita F., Jimenez R., Burgos M., Diaz de la Guardia R. // *J. Cell Sci.* — 1998. — Vol. 111, Pt. 10. — P. 1433–1439.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

- Аберрации (аномалии) хромосом (см. также Аномалии кариотипа)
- идентификация 91, 144, 145, 155, 166
 - *de novo* 123, 342
 - родительское происхождение 148, 151
 - совместимые с развитием 93
 - структурные (см. также Мутации хромосомные, Хромосомные перестройки) 76, 85, 91, 94, 105, 106, 113, 123, 144, 145, 148, 152, 155, 158, 175, 180, 192, 195, 201, 228, 234, 512
 - хромосомные 60, 76, 93, 94, 100, 106, 124, 145
 - частота и спектр 124, 126, 128, 151-157, 168
 - численные (см. также Геномные мутации, Гетероплоидия) 111, 169, 174, 172, 216, 476, 512
- Абортусы
- индуцированные 119, 282
 - спонтанные 177, 195, 250, 488
 - с хромосомными аномалиями 16, 38, 97, 164, 168
- 5-азациитидин 380, 410
- Азооспермия 103, 104, 113, 197, 199
- необструктивная 114-116
- Акридиновый оранжевый 450, 501, 509, 542
- Акрихин 501, 502, 541
- Активность
- митотическая 38, 58, 133, 134, 136, 334, 351
 - неоцентромерная 345
 - пролиферативная 51, 162, 478
 - «ранних» генов 426, 428, 442, 443, 449, 458, 469, 472
 - рибосомных генов 442, 457
 - транскрипционная ЯОР 70, 378, 380-398, 435
 - X-хромосомы 422
- Акросома 26, 31, 32
- Алгоритм биохимического скрининга в I триместре беременности 309
- биохимического скрининга во II триместре беременности 306
 - верификации хромосомных болезней у плода 354, 357
 - диагностики мужского бесплодия 116
 - диагностики при подозрении на однородительскую дисомию у плода 350-351
 - диагностики при хромосомном мозаицизме в хорионе (плаценте) 244, 245, 348
 - идентификации маркерных хромосом 343-344
 - пренатальной диагностики хромосомных болезней 289, 294, 326, 349-351
- Аллантоис 24, 38, 40, 43, 47
- Альфафетопротеин (АФП) 243, 303, 304, 316
- Амнион 35, 38-40, 43, 50-51, 130, 219, 222, 236-237, 275
- Амниотическая жидкость 23, 129-130, 139-143, 170, 172, 217, 237, 238, 292-294, 304, 331-332, 336, 346-347, 361, 507
- ножка 38-40, 43, 47, 49
 - оболочка 283

- полость 37-40, 130, 283, 304
- Амниоцентез 139-140, 237, 291-292, 329-330
- Амниоциты 130, 140-143, 172-174, 237, 332-333, 339, 347, 373, 508, 522
- Амниофильтрация 140
- Анафаза
 - мейоза 78-79, 82, 88, 126, 155, 158, 182-183, 208, 543
 - митоза 59, 76, 89, 93, 219, 222
- Анемия Фанкони 210, 211, 365, 372
- Анеуплоидия (см. также Моносомия, Трисомия, Полисомия) 73, 427, 445
 - возрастзависимая 176-181, 212, 360
 - механизмы возникновения 77-80
 - молекулярная диагностика 368-371
 - множественная 78
 - мозаичная 163, 166, 169, 197, 210, 217-218, 224, 228-229, 343
 - в гаметогенезе 82-83, 126, 145, 151-158, 202, 207, 212, 213, 224
 - частота 83, 121, 161, 220, 222, 464
 - по аутосомам 163, 178, 222, 284, 314, 348
 - повторные случаи 209, 212, 318, 320
 - полная 225, 228, 343, 348
 - по половым хромосомам 163, 173, 197-199, 222, 228-230, 284, 348
 - по акроцентрическим хромосомам 208, 394-398
 - родительское происхождение 124, 128, 147, 157, 464
 - спонтанная 218, 220, 230
 - сублетальная 241
 - у носителей аномального кариотипа 188, 191, 194-200, 204
 - у носителей 9ph 195-196
 - частичная 200, 398
- Ангиобласты 49
- Андрогенез 410, 441
- Андрогения 236
- Аномалии кариотипа
 - летальные 73, 150, 170, 172-175, 186, 192, 226, 249, 254-256, 280, 347, 474-475
 - структурные 58, 95-97, 105, 140, 156, 165, 481, 543
 - сублетальные 170, 172, 173, 175, 226, 238, 241, 255, 347, 398
 - численные 58, 72, 95-97, 105, 140, 152, 168, 197-198, 206, 219, 247-248, 266, 323, 364, 464, 481, 483, 543
 - аномалии развития 197, 200, 251, 258, 268-273, 276, 279, 283, 300, 341, 345, 358
 - желудочно-кишечного тракта 258
 - головного мозга 271-274, 277, 279-282, 301
 - изолированные 270
 - конечностей 267, 269, 272-274, 277, 279, 281, 301, 359
 - лица 49, 242, 251, 264-272, 274-276, 279, 281, 287, 301, 359, 402
 - лимфатической системы 251, 263, 280, 282
 - множественные 267, 276
 - нервной системы 53, 252, 269, 300
 - репродуктивной системы 200, 229
 - сердечно-сосудистой системы 283, 287, 300-301, 369
 - скелета 251, 267, 279
 - сочетанные 282
 - черепа 264, 267, 269-272, 275, 279, 281, 287, 359
- Аntenатальная гибель 240, 255, 358
- Аntenатальное развитие 19, 54
- Аntenатальный период 52, 54, 255

Антитела к БДУ (АТ-БДУ) 450, 452, 453, 455, 510

— к иммуноглобулинам 296, 326

— к 5-метилцитозину (АТ-MeC) 429-431, 433-434, 436, 444, 458-459, 468, 470, 536-537

— к резус-фактору 325-326

— конъюгированные 510, 530

— специфические 60, 127, 296

Анэмбриония 38, 147, 162, 166, 255, 427, 428

Аорта, патология дуги 262-263, 283

— коарктация 263

— стеноз 263

Апоптоз 28, 121, 226-227, 412-415

Артерии главные 257

— маточная 244

— подключичная 262, 283

— почечная 48

— пупочная 47, 50

— сердечные 257

— сонная 262, 283

— спиральная 49, 244

Артерии пуповины 283, 284

— гипоплазия 271, 284

— единственная 269, 270, 272, 302

Архитектоника клеточного ядра 462, 463, 465, 466, 469, 472, 478, 481, 488

Асинапсис 120

Аспермия 116

Аспирация амниотической жидкости 292

— ворсин хориона и плаценты 131, 237, 292

— крови 292

— тканей яичка 101

— фолликулов 121, 122

— цервикальной слизи 366

Ассоциированный с беременностью плазменный протеин А (РАРР-А) 307-308, 369, 373-374

Атаксия-телеангиэктазия 210, 211, 328, 355

Атрезия пищевода и двенадцатиперстной кишки 258, 269, 270, 272-273, 282, 301

— фолликулов 30, 121

Ацентрические фрагменты хромосом 89, 148, 152

Ацетилазы 403-405, 468

Ацелирование гистонов 68, 380-381, 394, 400, 403, 404-406, 466-467, 473

Б

Банк стволовых клеток 372-373

— пуповинной крови 372-373

Белки активаторы 381, 402

— аргентофильные 376, 377, 382, 464, 573

— гистоновые 26

— гликопротеины 30, 307

— кислые 27, 376, 377

— маркерные сывороточные (МСБ) 137, 291, 295, 299, 303-307, 316, 328, 369, 373, 483

— метилцитозинспецифичные 404, 411, 415

— митотического веретена 127, 216

— мукополисахариды 24, 31

— основные 402

— репрессоры 381, 403

— рибонуклеиновых комплексов 35

— рибосомные 376, 377, 382

— синаптомемного комплекса 209

— синтез 35, 385

— супрессоры 411

— хроматиновые 381, 406, 467

— эмбрионспецифические 291, 293, 303

Бесплодие 17, 100, 181, 184, 192, 197-199, 201-203, 372

— мужское 59, 100-101, 111-117, 199

Беременность, исход 210, 239-240, 244-245, 295

— многоплодная 227

- неразвивающаяся 164-165, 239-320
- определение срока 20, 136
- осложнения 139, 239-244, 292, 297, 308, 325, 411
- патология 299
- прерывание 37, 119, 164, 173, 195, 201, 254-256, 282, 289, 302-305, 313, 316, 322, 330, 341-342, 348-354, 358-361, 366-367, 389
- прогрессирующая (развивающаяся) 163, 166, 170, 174, 184, 201, 224, 239, 241, 284, 307, 310-311, 320, 324, 347-349, 428
- тактика ведения 244-245, 289, 294, 300-302, 322, 324, 334, 342-343, 349-352, 361-362, 374, 485
- течение 219, 239-245, 301, 389, 411
- у носительниц аномального кариотипа 203-205
- физиологическая 201-203
- Rh-конфликтная 325-326, 329
- Биваленты 78-82, 96, 106-109, 121-122, 182, 197-199, 544
- Биопсия blastомеров 118, 362-363, 366
 - плаценты (см. также Плацентобиопсия) 341, 348, 350
 - полярных телец 123, 329, 363
 - тканей плода 291, 293
 - трофэктодермы 118
 - хориона (см. также Хорионбиопсия) 131, 292, 341, 348, 350
 - яичка 101, 110
 - яичников 118
- Бластомеры 21, 33, 34, 35, 407, 440, 441, 443, 462, 464, 467
 - анеуплоидные 161, 170, 227
 - аномальные 163
 - гаплоидные 161
 - гетероплоидные 162, 222, 224
 - диплоидные 225, 226
 - дифференцировка 226, 467
 - изолированные (единичные) 118, 129, 329, 330, 363, 364
 - использование для диагностики 129, 293, 329, 330, 363, 364, 366
 - многоядерные 161, 225
 - неслучайное расположение 225
 - поляризация 34
 - тотипотентные 364
 - селекция 170, 225
- Бластопатия 286
- Бластоциста 21, 33-37, 70, 73, 118, 159-163, 219, 224-226, 245, 333, 364
 - «вылупление» («хэчинг») 21
 - инактивация X-хромосомы 70
 - имплантирующаяся 37
 - использование для диагностики 364
 - метилирование генома 407, 408, 413
 - метилирование хромосом 440-444, 459
 - мозаичная 160-163, 224-226, 245
 - формирование 21, 162-163
 - частота анеуплоидии 161-162
- Бластуляция 33, 285
- Близнецы dizиготные 227
 - монозиготные 64, 203
 - резорбция 227
- Блок (блокада) веретена деления 76, 224
 - гаметогенеза 197
 - митоза 25, 76, 77
 - мейоза 76, 82, 83, 110, 122, 124, 155, 200
 - оогенеза 25, 28, 122, 124, 126, 127, 154, 155, 181
 - полиспермии 32
 - репликации 452
 - сперматогенеза 102, 104, 110, 115, 213
 - транскрипции 403, 469
- Блоки высокоповторяющейся ДНК 465

- гетерохроматиновые 64, 109, 381, 438, 442, 448, 449, 458, 465, 471, 475, 504, 505, 506
 - метилированной ДНК 394
 - С-блоки 68, 381, 415, 448, 458, 462
 - Q-блоки 447, 448
 - G-блоки 68
 - NOR-блоки 63
 - R-блоки 68, 415, 419, 507
 - T-блоки 62, 419
- Болезни врожденные 15, 129, 288, 290, 295
- гемолитическая 143-144, 284, 326, 329, 371
 - «импринтинга» 191, 241, 348, 350, 410, 475
 - инфекционные 113, 297
 - наследственные 15, 18, 100, 131, 290, 294-295, 326, 353-354, 362-363, 373-374, 484, 488
 - моногенные 126, 289, 291, 294-296, 328, 351-355, 358-361, 364, 387-388
 - мультифакториальные 211, 248
 - эпигенетические 418
 - трофобластические 308
 - хромосомные 58, 119, 130-134, 137, 142, 166-167, 177-181, 195, 201, 206-209, 214, 217, 226, 246-254, 260-263, 266, 271, 273, 285-291, 293-297, 301, 303, 305, 308-330, 349-352, 357-362, 366-370, 374, 387-390, 395, 411, 445, 462, 474, 476-478, 483-489
 - «экспансии» 116
- Бромдезоксигуанидин (БДУ) 134, 441, 449-453, 455, 507, 508, 510, 542

В

- Валики нервные 21, 41-43
 - половые 24, 27, 48
- Васкуляризация 136, 284, 494

- Вентрикуломегалия 268-272, 301
- Веретено деления двухполосное 160
 - микротрубочки 61, 80, 83
 - нарушения образования 80, 83, 176, 179
 - преобразования 127, 176
 - трехполосное 160
- Верификация диагноза 133, 142, 275, 277, 280, 349, 352, 354, 357-358, 495
- Внутренняя клеточная масса (ВКМ) 34, 35, 220-222, 417
 - образование 21
 - дифференцировка 38, 129, 219, 222, 408, 467
 - производные 130, 418
- Водянка (отек) плода 262-264, 269-272, 280, 284, 302
- Возраст зародыша 21
 - репродуктивный 27, 29, 179-80, 207, 212
- Вспомогательные репродуктивные технологии 54, 100, 114, 197, 202-203, 215, 293, 362, 364, 487

Г

- Гаметогенез, временные характеристики 20, 24
 - и геномный импринтинг 406
 - и хромосомные аномалии 72, 80, 85, 91, 97, 150, 177, 181, 192, 213, 219, 234, 241, 285
 - половые различия 99-100
- Гаметы (см. также Ооциты, Сперматозоиды)
 - анализ хромосомного набора 15, 110, 113, 150, 153, 188, 197, 207, 460
 - и геномный импринтинг 406-409, 475
 - комплементация 184, 235, 474
 - образование 76, 187, 191, 197, 214, 310, 323, 342
 - перезревание 176

- селекция 83, 95, 106, 150, 180, 184, 188, 209, 214, 215
- созревание 82, 96, 99, 104, 127, 128, 150, 181, 182, 198, 215
- с хромосомными аномалиями (несбалансированные) 76, 80, 83-85, 150, 159, 167-168, 177, 181-186, 190-191, 194, 199, 203, 206-207, 212-216, 310, 323, 342
- Гаплоидия 168, 174, 226, 479
- Гаплоидный бластомер 161
 - геном 63, 73, 76, 236, 434, 546
 - зародыш 128, 161, 479
 - набор хромосом 24, 26, 32, 60, 72, 73, 98, 99, 281, 336, 479
- Гемиметилирование 440, 441, 443, 459, 471
- Генетическая карта репродуктивного здоровья 211, 296, 373, 485, 489
- Генетический груз 15, 85, 288
- Геном зародыша 35, 224, 407-408, 426, 443, 471, 481-482, 489
 - материнский 76, 236, 296, 407-408, 410, 464, 486
 - отцовский 76, 236, 296, 407-408, 441, 467
 - функции 16, 18, 52, 66, 399, 404-411, 434-435, 441, 459-463, 466, 471-478, 482, 488-489
- Гены «анеуплоидии» 80, 209
 - андрогенового рецептора (AR) 115, 116
 - апоптозные 227, 413
 - главного локуса гистосовместимости HLA 226, 365, 472
 - гемизиготные 479
 - гомеобоксные 41, 46, 408
 - детоксикации 176, 256
 - дифференцировки 62, 413, 420, 117, 412
 - «домашнего хозяйства» 62, 68, 400, 416, 472
 - импринтированные (см. Импринтированные гены)
 - клеточного цикла 80, 163, 209-211, 213, 382, 412, 426, 458
 - компенсация дозы 394, 397, 407, 429
 - малых РНК 420
 - «мейотические» 82, 127, 209, 485
 - предрасположенности 210-212, 216, 256, 481, 485
 - «ранние» 249, 253, 413, 420, 426, 428, 442-443, 449, 454, 458, 469, 472, 480
 - регуляторы 245, 253, 382, 413, 420, 426, 458, 476-479, 488
 - рецепторов 256, 438, 479
 - репарации 176, 212
 - рибосомные (см. Рибосомные гены)
 - сегментная локализация 62-63, 68-69, 418, 423, 438, 459, 468-469
 - структурные 67, 209, 375, 426, 443, 459, 466, 468-471, 476-478
 - супрессоры 245, 411-413
 - CFTR 115-116
 - тканеспецифичные 68, 400, 405, 414, 438, 451, 454
 - уникальные (однокопийные) 407-408, 477
 - фолатного цикла (MTHFR, MRR) 209, 211, 256
 - хромосомная локализация 70-71, 419, 460, 463
 - Xist 407-410, 467
 - X-специфические 229, 407, 410, 467, 472
 - число в геноме 70
 - чужеродные 372, 405, 407
 - регуляция экспрессии 402, 404-409, 413, 442, 449, 463, 466, 468, 472-473, 476-478, 480, 487
 - энергетического обмена 420

- эффект дозы 391, 394, 398, 407, 474, 476-480, 488
- Y-специфические 70, 114, 229
- Генные ансамбли 17, 247, 375
 - болезни (см. также Болезни могоенные, Болезни мультифакториальные) 17, 288-295, 353, 387, 388, 485
 - кластеры 17, 385, 392-393
 - конструкции 372
 - полиморфизмы 481, 488
 - сети 17, 211
- Гетеродисомия (гетеро-ОРД) (см. также Однородительская дисомия) 234, 242, 474, 482
- Гетерозиготное носительство перестроек хромосом 93, 106, 177, 181-182, 191-196, 215, 323, 364
 - состояние локусов 91, 116, 147, 325, 485
- Гетероморфизм гомологов 63-66, 206-208, 380, 427-428, 439
- Гетероплоидия (см. также Мутации геномные) 72, 124, 142, 145-146, 154, 159, 163-164, 177, 228, 459, 533
 - Анеуплоидия (см. Анеуплоидия)
 - аплоидия (см. Гаплоидия)
 - мозаичная форма 74, 144, 159, 162, 166, 218-219, 224-255
 - полиплоидия (см. Полиплоидия)
 - полная форма 144, 159, 228
- Гетерохроматин активный 420
 - влияние на сегрегацию хромосом 152, 196, 208, 215
 - деконденсация 148, 458
 - инактивация 403
 - интеркалярный 466, 468, 472
 - конститутивный 67, 69, 381, 381, 425-426, 442, 449, 456, 466, 472
 - локализация генов 426-428, 449, 458-459, 466, 469-470
 - молекулярные характеристики 426, 435, 438
 - прицентромерный 65, 69, 393, 405, 424-425, 430-435, 443, 458
 - репликация 70, 454-456
 - спутничная 424
 - структура 402
 - структурный 69, 146, 465
 - уровень метилирования 381, 399, 427, 439, 442, 461
 - факультативный 69-70, 466, 472
 - функциональная активность 427, 443, 445, 449, 461, 465-466, 469, 471
 - X-хроматин 58, 467
 - центромерный 402
 - Y-хроматин 58
- Гетерохроматиновые блоки (сегменты, районы хромосом)
 - влияние на рекомбинацию 385
 - в мейозе 109
 - линейные размеры 445-449, 457
 - локализация 65, 194
 - методы визуализации 64, 445, 504, 505, 506
 - 1qh 65, 152, 340, 417, 425, 430, 442, 444, 453-456, 471
 - 9qh 65, 152, 181, 340, 417, 425, 430, 442, 444, 453-456, 471
 - 13cenh 65
 - 14cenh 65
 - 15cenh 65, 417, 453
 - 16qh 152, 340, 417, 425-430, 442, 444, 453-456, 471
 - 22cenh 417, 453
 - Yqh 65, 152, 442,
 - пахитенных хромосом 109
 - полиморфизм 66, 475
- Гетероцикличность наборов хромосом 124, 128, 462
- Гибель зиготы 150, 174
 - массовая клеток 83, 104
 - оогониев 28, 121
 - плода 143, 164, 169, 174, 226, 229, 240-242, 255, 289, 292, 311,

- 330, 358, 360, 366, 382, 389
- соматических клеток 73, 224
 - эмбриональная 38, 56, 168, 226, 250, 263, 286, 401, 476, 478-483, 488
- Гибридизация *in situ* (FISH) 17, 58-60, 75, 108, 111-113, 123, 126, 129, 133, 142-144, 148-151, 157-160, 162, 196-200, 203-208, 213, 222, 226, 229-231, 238, 248, 276-280, 293, 318, 334-336, 340-345, 358, 363, 362-366, 377-378, 390, 417, 463, 484, 509-533
- Гигрома шеи 263-265, 269, 270, 272, 273
- Гидронефроз 269, 273, 279, 282
- Гиногения 236
- Гипергаплоидия 152, 153, 156
- Гиперметилирование ДНК 402, 412
- хромосомных сегментов 422, 424, 427-428, 442, 458
- Гипогаплоидия 73, 80, 122, 152, 156, 158
- Гипометилирование ДНК 402, 407, 412, 426, 441, 443, 449, 457
- хромосомных сегментов 402, 424-426, 435, 442-443, 457-458, 471
- Гипоксия плода 136, 139
- Гипотеза активации латентных транспозонов 412
- активации протоонкогенов 412
 - двухступенчатой активации *p*-генов 380, 386
 - двухударная возникновения опухолей 413
 - двухударная возникновения анеуплоидий 82
 - взаимной активации гомологичных хромосом 480, 489
 - влияния гетерохроматина на нерасхождение хромосом 152
 - «генов анеуплоидии» 209
 - «исчезающего близнеца» 227
 - клеточного синдрома 285
 - компенсации дозы генов 429
 - «местных факторов» анеуплоидии 179
 - неравного числа клеток-предшественников 225
 - о гетерохроматине как регуляторе активности генов 466
 - ограниченного пула ооцитов 178
 - о локализации в гетерохроматине «ранных» генов 458, 469
 - постзиготической диплоидизации триплоидии 465
 - продуктивной линии 178
 - селективной нейтральности генетической гетерогенности 232
 - селекции бластомеров 225
 - сохранения генетической гетерогенности 232
 - сохраняющего эффекта мозаицизма 226, 229
 - функциональной дифференциации ЯОР 382, 392
 - цитоплазматических факторов анеуплоидии 212
- Гистогенез 53
- Гистоны ацетилирование 68, 380, 400, 403, 405-406, 473
- гипоацетилирование 70, 466, 467
 - деацетилирование 381, 394
 - метилирование 467, 468
- Голопрозэнцефалия 264, 268-272, 279
- Гонады аномалии развития 178, 200-201
- зачатки 23, 24, 48, 178, 408
 - женские 24, 28-30, 99, 117, 201, 207
 - индифферентные 201
 - мужские 24, 116
 - ткани 114, 206-207, 231, 319

— формирование 22-23, 117, 216
Гоносомы (см. также Половые хромо-
сомы) 61, 74, 198, 232, 370
Гонциты 23-24, 213
Горизонты Стритера 19-20, 46, 49
Группы риска рождения ребенка с
наследственной и врожденной пато-
логией 303, 326, 328, 354
— с хромосомными болезнями 301-
303, 310-311, 324, 359-360
Грыжа диафрагмальная 269-272
— кишечная 258
— пупочная 23
— спинномозговая 201, 304

Д

Двойни дизиготические 227-228
— монозиготические 227
Двойные-кольца 75
— спутники 63-65
— спутничные нити 65
— трисомии 167, 171-173
— ЯОР 63, 208, 389
Дезаминирование 400, 411, 412
Деконденсация гетерохроматина 148,
444
— хроматина 68, 113, 382
— хромосом 33, 444
— эухроматина 67
Делеции генные 116, 404, 423
— локуса AZF 105, 114-116
— рибосомных генов (ЯОР) 379,
390-391
— хромосомные 75-76, 85-87, 90,
94-95, 148-149, 152, 202-203,
480, 543
Деметилирование ДНК 401, 407, 413-
414, 427, 441-442
— хромосомных сегментов 427,
440-443
Дерматом 46
Деспирализация хромосом 380, 462,
471-472

Дефекты лицевого черепа 264, 269,
301, 359
— межжелудочковой перегородки
263, 274, 277
— нервной трубки 252, 269, 304
Диакинез 98, 102-104, 108, 118, 121-
122, 543
Диандрия 76
Дигиния 76, 160
Диктиотена 27-28, 99, 117, 121, 543
Диплоидизация 465
Диплоидия 113, 236
Диплотена 25, 98, 102-104, 108-109,
117-119, 122, 543
Дисбаланс генный 71, 191, 204, 254,
379, 474-477, 482
— в системе половых хромосом 323
— хромосомный 16, 38, 74, 97-98,
161, 166, 169, 184, 187, 192, 195,
220, 224, 239-240, 245- 271, 282,
285-287, 302, 310, 321, 324, 346,
358-361, 375, 394, 398, 428, 474-
478, 481, 488
Дискордантность кариотипов 227,
240
Дисомия 80, 110, 113, 151, 152, 156,
190, 207
— однородительская (см. Одноро-
дительская дисомия)
— половых хромосом 73, 181, 199-
200, 317
Диспермия 159-160, 281, 410, 441
Дифференциальная окраска хромо-
сом 59, 111, 126, 133, 144, 541-542
— избирательная (селективная) 59,
375
— методы 59, 62, 98, 106, 133, 168,
331, 334, 336, 338, 340, 345, 484,
495, 429, 470, 484, 495
— система обозначений 59, 63, 541-
542
— специальные методы 64, 144,
336, 418, 470, 507, 509

- типы 60, 62
- С-окраска 144, 448, 504
- G-окраска 56, 126, 133, 144, 336, 338, 418, 498-499
- Q-окраска 144, 501, 541
- QFH-окраска 57, 77, 103, 107, 125, 148, 149, 185, 205, 446, 502-504, 541
- R-окраска 144, 418, 500
- N-окраска (Ag-NOR окраска) 60, 67, 344-345, 377-378, 383, 396, 457, 464, 533-534
- Дифференцировка амниона 130
 - внутренней клеточной массы 38-42, 46, 49, 52-53
 - неспецифическая 53
 - первичная 38-39, 226, 408, 467, 479
 - половая 48-49, 101, 115, 201, 203
 - половых клеток 24-26, 213
 - специфическая (терминальная, тканевая) 53, 62, 227, 458
 - клеточная 53, 220-221, 226, 394, 404-405, 413, 420, 444, 456, 461, 468, 478
 - трофобласта 38-39, 129, 137, 219, 285, 425, 444, 456
- ДНК альфоидная 62, 208-209
 - библиотеки 145, 484
 - метилирование 380-381, 384, 393-394, 399-417, 422-425, 457, 462, 465-473
 - методы анализа 17, 114-115, 145, 149, 198, 293-296, 319, 325, 330, 349-364
 - митохондриальная 212
 - обогащенная АТ-парами 68, 415, 418, 426
 - обогащенная GC-парами 62, 68, 400, 402, 404, 415, 418
 - одностранные разрывы 415, 418
 - плода в крови матери 367-368
 - повторяющиеся последовательности 66, 477, 146, 366
 - полиморфные локусы 145-148, 349, 353, 366, 370, 435, 475
 - репликация 77, 85, 93, 160, 380, 399-401, 449-451, 507
 - репарация 95, 176, 212, 216, 405, 412
 - рибосомная (см. также рДНК) 380-381, 384-385, 392-393
 - сателлитная (см. также сатДНК) 62-63, 69-70, 392-393, 415, 424-426, 435, 438, 465
 - синтез 34, 134, 353, 401, 450
 - уникальные последовательности 67
 - фракции 67
 - эгоистическая 466
 - ДНКазы I 68, 414-417, 420-423, 435, 439, 457, 468, 514, 535
 - сайты-мишени 414, 419
 - гиперчувствительные сайты (ДН-сайты) 414
- ДНК-зонды, локус- и район-специфические 75, 148, 149, 205, 342-345, 363-364, 377, 390
 - прицентромерные 111, 113, 120, 123, 125, 135, 143, 205, 208, 276-277, 279, 344, 345, 364
 - хромосом-специфические 62, 120, 123, 135, 149, 158, 363-364
 - эффективность связывания 230, 523, 527
- ДНК-полимераза 414, 514, 535-536
- ДНК-полиморфизм 146-147, 353
- Доимплантационная диагностика 181, 203, 324, 330, 362-366, 368, 483, 487
 - моногенных болезней 126
 - прекоцепционная 126
 - по бластомерам 329-330
 - по полярным тельцам 126, 329-330
- Дробление, аномалии 84, 118, 160, 486

- зиготы 33-34, 83-84, 128, 219-221, 330, 364, 366
 - и поведение хромосом 85, 95-97, 124, 128, 147, 150, 159-163, 180, 191, 209, 220, 224, 228, 232-236, 482
 - и функции хромосом 382, 407, 413, 440-443, 467, 480
- Дубликации генома 77, 236
- инвертированные 87, 90
 - тандемные 87, 379
 - хромосомные 75-76, 87, 94-95, 148, 152, 534
- D-рисунок 414

Ж

- Желточный мешок 21, 35, 38-40, 43, 47-48, 51, 54, 219, 222, 258, 283, 304, 423
- пузырек 39
- Жизнеспособность клеток 84, 238, 285
- плода 173, 255, 310, 389
 - эмбриона 66, 229, 443

З

- Задержка внутриутробного развития 119, 204, 218, 239-242, 251, 267-273, 276, 279-281, 287, 301, 343, 347, 475, 478, 482
- делений дробления 441
 - мейоза 119
 - метилирования ДНК 470
 - оссификации 259, 266, 301
 - цитотомии 202
- Зачатие 20, 181, 236, 296-298, 327, 485
- Зачатки аллантаоиса 40
- глаз 21, 46
 - гонад 23, 24, 27, 48, 178
 - зубов 22
 - конечностей 22
 - легких 22, 48

- матки и труб 48
 - мозга 42
 - нервной системы 39
 - органов и систем 51, 257, 478
 - печени 47
 - почки 48
 - сердца 41, 43, 46, 47
 - эмбриональные 24, 52, 53, 286, 408, 463, 478
- Зигота моносомная 187, 191, 234, 482
- нормальная (диплоидная) 21, 33-34, 60, 83, 118, 232-233
 - полиплоидная 84, 118, 160
 - сбалансированная 187, 323
 - трисомная 84, 187, 191, 232-233
 - энуклеированная 126
- Зиготена 70, 98, 102, 105, 109, 117, 119, 211, 545

И

- Идеограмма 60, 63, 109, 430, 546
- Изодисомия (см. также Однородительская дисомия) 74, 84, 234, 241
- Изохоры 67-69, 418, 434
- Импантация 19-21, 32, 35-38, 129, 150, 159-163, 168, 181, 215, 225-226, 245, 254-255, 285-286, 293, 304, 307, 329, 364-365, 408, 443, 478-479, 481
- Импринтинг, болезни 241, 348, 350, 410
- геномный 405-411, 469, 473-475, 480, 483
 - гаметический 407
 - и однородительская дисомия 411, 475
 - хромосомный 473-475, 482-483
 - эффект 204, 241, 345, 348, 411
- Импринтированные гены, дисбаланс 191, 410, 411, 474, 475, 480-482, 488
- кластеры 394, 406, 411, 423-424, 458, 473
 - маркеры 409

- метилирование 406-408, 458, 473
 - репликация 451, 455
 - структура 409
 - хромосомная локализация 411, 458, 473
 - Импринты 406-407, 473
 - Инактивация генов 401, 402, 408, 426, 428, 443, 458
 - гетерохроматина 403, 469
 - р-генов 380-382, 393
 - транскрипции 412
 - X-хромосомы 70, 109, 409-410, 422-423, 433, 467-468
 - Инверсии гетерохроматинового района хромосомы 9 (9ph, 9p_hqh) 65-66, 135, 165-166, 185, 194-196, 208, 340
 - парацентрические 75, 86, 192, 339
 - перицентрические 75, 86, 192, 340
 - поведение в мейозе 192-193
 - частота 192-195
 - Инвазивная диагностика 254, 271, 294-298, 302, 313-315, 318, 320, 323-327, 349, 351-352, 373-374, 483
 - Инвазивные вмешательства 294-298, 303-305, 308-310, 315-316, 322-324, 339, 342, 351, 360-361, 366
 - методы 36, 98, 129, 139, 253, 290-293, 326, 329-332, 368
 - Ингибин А 304-305
 - Индекс извитости пуповины 283-284
 - митотический 134-139, 331, 336, 426, 494-495
 - центромерный 61
 - Интерфаза 62, 68-70, 126, 208, 466, 533
 - Интерфазная цитогенетика 144, 250
 - Интерфазное ядро 58, 85, 129, 133, 230, 250, 276, 279, 334-336, 429, 453, 461-466, 472, 478, 512, 517, 527, 530, 533
 - Инъекция ооплазмы 372
 - полярного тельца 126
 - сперматозоида 111-112, 153, 159, 202
 - ядрышко 376-377
- К**
- Канал атриовентрикулярный (АВК) 257, 263, 274
 - Вольфов 48, 49
 - Мюллеров 48, 49
 - цервикальный 292, 366
 - Канальцы почечные 41, 48
 - семенные 24-26, 41, 104
 - стромальные 275, 281
 - Капацитация 31, 152
 - Кариограмма 56-57, 60, 107, 338
 - Кариотип 55, 60-64, 73, 97, 338, 484-485, 543
 - методы анализа 58, 129, 134, 140-144, 159, 162, 168-169, 174, 198, 250, 319, 332, 334, 337, 484, 498
 - абортуса 120, 162, 165, 256
 - анеуплоидный 57, 73, 120, 147, 173, 195, 225, 396
 - аномальный 57, 59, 72-73, 97, 105, 113, 159, 164, 168, 185, 192, 194, 197, 198, 203, 206, 219, 229, 238, 255-256, 262, 265, 272-273, 319, 323-324, 328, 364, 480-481
 - диплоидный 74, 84, 218, 234
 - женский 56, 61, 202
 - мозаичный 192, 197-202, 217, 225, 231, 238, 278, 318-319, 337, 370
 - мужской 61, 204
 - нарушения 19, 97, 140, 148, 168, 172, 370, 481
 - нормальный 60, 62, 84, 181, 194, 202, 204, 217, 225, 305, 322, 324, 348, 350-351, 395-398
 - несбалансированный 74, 185, 188-195, 215, 341-342, 359
 - ооцита 125, 160
 - плода 127, 141, 148, 170, 172,

- 189, 206, 239, 302, 322, 324, 332, 346, 350-351, 358, 421
- пробанда 206
- сбалансированный 75, 85, 185, 189-194, 215, 341
- сибсов 320
- «псевдодиплоидный» 349
- 45,X 83, 135, 165, 171, 174, 200-202, 227-230, 243, 255, 263-265, 269, 272-273, 280, 283, 318
- 47,XXX 173, 200, 280
- 47,XXY 81, 173, 180, 195, 199-200, 228, 280, 318, 320
- 47,XYU 73, 105, 173, 199-200, 207, 318
- 69,XXX 73, 120-121, 165, 174, 261, 284
- 69,XXY 73, 165, 174, 284
- 69,XYU 73
- Кариотипирование 55, 58, 60
 - абортусов 164, 169
 - автоматическое 338, 351
 - зародышей 84, 128, 161
 - как способ дифференциальной диагностики 252-253, 265, 321
 - молекулярное 366, 370-371, 483-484
 - неудачи 142-250
 - ооцитов 124
 - плода 140-142, 177, 188, 250-252, 273, 310-311, 317, 320, 326-327, 360, 370, 373, 484
 - показания для пренатального кариотипирования 177, 326-327, 339, 360
 - постнатальное 94, 184
 - правила 64, 144, 333-338
 - пренатальное 94, 137-139, 196, 203, 253, 265, 271, 293, 302, 307-308, 311-317, 320, 322, 329, 332, 339, 343, 357, 359-360, 373, 387
 - прижизненное 16, 166
 - спектральное (SKY) 123, 129, 144
 - стандартное 73, 128, 196-198, 217, 229, 318, 322-324, 331, 336, 339, 370
 - супружеских пар (родителей) 197, 337, 340-342, 351-352
 - эффективность 142
- Квадривалент 182, 183
- Кинетохор 80, 83, 91, 224
- Кисты задней черепной ямки 269, 278
 - сосудистых сплетений мозга 269-272, 277-278, 301
 - в плаценте 270
 - в брюшной полости 277
- Кистоз почек 277, 282-283, 356
- Клетки амниотической жидкости (КАЖ) (см. также Амниоциты) 129-130, 139-141, 170-173, 217, 237-238, 293-294, 331-333, 336-337
 - буккального эпителия 58, 218, 320, 517
 - внутренней клеточной массы (ВКМ) 35, 408, 418, 467
 - гаплоидные 26
 - герминативные 201, 210
 - гранулезы 30, 122
 - децидуальные 36, 307
 - дочерние 88
 - камбиальные 38
 - кишечного эпителия 279, 383, 416, 496-497
 - костного мозга 58-59, 383, 496-497
 - Лангханса (см. также Цитотрофобласт) 38, 130, 134-136, 237, 456
 - Лейдига 25
 - лимфобластоидные 422, 425
 - лучистого венца 31
 - малигнизированные 227, 377, 426
 - материнского происхождения 141-142, 237, 331-333, 346, 366, 492
 - мезенхимы стромы ворсин 132-134, 170, 237, 333

- мейотические 102, 109
- многоядерные 226
- недифференцированные 220-221
- незрелые половые (НПК) 101-106, 113
- опухолевые 227, 411-413, 425
- первичные половые (ППК) 22-25, 48, 54, 178, 214, 408
- печени 73, 372, 383, 496-497
- плода в крови матери 362, 367-368
- половые 23, 27-28, 98, 199, 206, 213-214, 406-408, 473, 485
- почки 416, 451, 496
- Сертоли 26, 115, 127
- слизистой оболочки матки 36
- соматические 26, 55, 70-73, 83, 93, 109, 208-210, 338, 393, 408-409, 433, 465-466
- сперматогенного ряда 24-26, 102-106, 113-114
- стволовые 24, 365, 372, 444, 486-489
- тотипотентные
- трофобласта 35-38, 73, 84, 161, 172, 226-227, 245, 304, 307, 363-366, 410
- трофэктодермы 36, 467
- фолликулярные 24, 27, 28, 29, 30
- хориона и плаценты 130-132, 137-138, 142, 147-148, 162, 169-172, 181, 217-218, 227-228, 237-238, 240, 243-245, 331-333, 336-337, 346, 366, 390, 418-420, 426-427, 445, 449, 452-453, 457-459, 467-470, 475, 482, 492, 495
- целомического эпителия 24, 42
- экстраэмбриональные 172, 239, 383, 424, 451
- эмбриональные 73, 84, 129, 172, 220-221, 227, 383-384, 406, 417-418, 423-425, 439-442, 445, 449-458, 470, 473, 486
- эпителиальные 35-36, 104, 130, 134, 137, 237, 332
- Клеточная сортировка 367
 - терапия 365, 371-373,
- Клеточные клоны 74, 239-240
 - культуры 212, 384
 - летали 479, 482
 - линии 217, 220-227, 230-231, 240, 280, 367
 - элементы 104, 127, 366-367
- Клеточный синдром 285-286
- Клеточный цикл, блок 83, 224
 - контроль 82, 209, 224, 227, 382, 412, 450
 - незавершенный 77
 - параметры 133-134, 179, 285, 450-454, 459
 - стадии 55, 58, 127, 134, 208, 376-377, 452, 464, 507
 - G1-фаза 85, 134, 227, 453, 464
 - G2-фаза 134, 227, 377, 452-453
 - S-фаза 68, 99, 134, 449, 450-455, 507
- Компактизация blastомеров 21, 33-34, 408
 - полового бивалента 109
 - хроматина 404, 415, 472
- Комплекс аномалий развития 197, 229
 - белковый 307, 376, 381, 466-468
 - деацетилазный 405, 468
 - гистонацетилазный 404
 - МВІР 172, 249, 253, 321
 - метилцитозинсвязывающий 402-405
 - осевой 41, 51, 54, 168
 - рибонуклеопротеиновый 29, 35
 - репликационный 449
 - синаптонемный 98, 106-108, 113, 193, 199, 209, 212-213
 - транскрипционный 376, 379-381, 404

- фетоплацентарный 244-245, 304-305
- Комплементация гамет 235
- Конденсация гетерохроматина 449
 - и метилирование 444, 449
 - преждевременная 118, 464, 544
 - хроматина 70, 405
 - хромосом 106, 118, 122-126, 154, 418, 444, 507
 - хромосомных сегментов 68
 - Конъюгация аномальная 105, 182, 192-193, 196-200, 208, 215
 - варианты при анеуплоидии 120-121, 199-200, 207
 - хроматидная 82
 - хромосом 98-99, 106-109, 117, 127, 461, 480, 485
- Контаминация 131, 142, 143, 237, 331, 333, 346, 363, 492
- Копчико-теменной размер (КТР) 41, 257, 266, 283, 308
- Кордоцентез 143-144, 237, 291-293, 329-330, 341, 348-352, 361, 387, 492
- Критические периоды развития 37, 52, 224, 285-286, 294, 573
- Кровоток плацентарный 49-51, 284
 - показатели 244, 257-258, 262
- Кроссинговер мейотический 98, 147, 193
 - митотический 96
 - неравный 379
 - частота 68
- Л**
- Лептотена 98, 102-105, 109, 117-119, 213, 544
- Лимфоциты 144, 198, 319, 416, 422, 430, 436, 439, 445, 451, 456, 507
 - В-лимфоциты 438
 - периферической крови 56, 148-149, 169, 173, 196-198, 201-205, 217, 228-229, 337, 383, 390, 395, 417, 425, 430, 435-438, 458-459, 490, 517
- пуповинной крови 129, 142-143, 172-174, 217, 237, 294, 330-339, 346, 373, 387-390, 395-397, 428, 436-438, 440-442, 458, 492
- Т-лимфоциты 438
- ФГА-стимулированные 56, 59, 143-144, 185, 196, 205, 218, 230, 334, 347, 384, 429, 470, 492, 507, 508, 511
- Локусы AZF 105, 114-116
 - высокополиморфные 91, 145, 148
 - гистосовместимости (HLA) 256, 365, 472
 - импринтированные 451, 455, 459
 - метилированные 424, 429
 - транскрибируемые 71, 450
 - специфические ДНК-зонды 75, 108, 111, 129, 149, 203, 230, 342, 344, 364, 525
 - 11p15 424
 - 15q11-q13 423, 424
- М**
- Макроглоссия 274-276
- Маловодие 140, 269-272, 281, 292
- Маркеры биохимические 243-244, 271, 291, 307, 324, 328
 - ДНК-маркеры 91, 114-115, 124, 146-147, 475, 515
 - клеточного цикла 452
 - М-маркеры 430
 - молекулярные 157, 295, 345, 353, 409, 418
 - морфологические 63, 430-433
 - ультразвуковые (УЗМ) 251-254, 258-259, 265, 269-274, 291, 295, 301, 316, 324, 328, 359-360, 369
 - функционального статуса хроматина 451
 - хромосомные (см. также Маркер-

- ные хромосомы) 148, 343-345, 475
- хромосомных болезней 301, 326-328, 360, 369
- Маркерные хромосомы *de novo* 204, 339
- идентификация 205-206, 343, 484, 512
- сверхчисленные 78, 204, 198, 203, 339, 341-345, 351
- семейные 204, 345
- частота 203-204, 343
- Маркерные фенотипы 177
- Мегацистик 258, 277
- Межхромосомный эффект 184, 202, 208, 479
- Мезобрахиалангия 267
- Мезодерма внезародышевая 37-40, 129, 222, 237, 240, 245, 425
- осевая 41
- зародышевая 38, 42-43
- Мейоз 24, 27-30, 70, 76-80, 83-85, 95-100, 197-199, 209, 212, 469
- блок 25, 28, 83, 110, 188, 199, 211
- второе деление 25, 79-82, 105, 122-126, 147, 157, 179, 208, 233, 363, 395
- контроль 82, 209-210, 485
- первое деление 25, 78-84, 105, 122-123, 127, 147, 178-180, 208, 233-234, 395, 427, 428, 464
- половые различия 25, 28, 98-99, 214
- Мейоциты (см. также Ооциты, Сперматоциты) 101, 109, 120-121
- Метафаза мейоза I 25, 83, 98, 102, 104, 108, 118, 121-122, 127-128, 154, 157, 462, 544
- мейоза II 25, 30, 73, 98, 100, 102, 104, 118, 121, 124, 127, 153-156, 158, 182, 544
- митоза 55, 77, 449, 450
- первого деления дробления 124, 128, 180, 382, 461-462, 480
- Метилаза 400-401, 405
- Метилтрансфераза 400-402, 404, 407-408, 410, 413
- 5-метилцитозин 399-405, 411, 418, 429-433, 436, 459, 468-470, 534-536
- Метилирование генов 407-408, 412-413, 438, 442
- генома 407, 411, 441
- гистонов 467-468
- дифференциальное 409
- ДНК 399, 402-407, 413, 462
- *de novo* 401, 404-405, 409, 472
- защитные функции 405
- и геномный импринтинг 406, 469
- и репликация 401
- как маркер состояния хроматина 402-405, 409, 416, 419-420, 443, 449
- как механизм клеточной памяти 381
- как фактор регуляции активности генов 380, 399-404, 412, 422, 443, 458, 469-471
- неспецифическое 413
- *p*-генов 381, 394
- рДНК 380-381, 424
- специфическое 413
- CpG-динуклеотидов 399, 405, 410-413, 468-469
- CpG-островков 399, 407-408, 411
- хромосом и хромосомных сегментов 413-414, 420, 438-443, 449, 471
- цитозина 399, 405, 415, 467
- Микрогнатия 269, 272, 275-277, 281
- Микроделетии в локусе AZF 105
- хромосомные 95, 114
- Микроделетсионный анализ 114-116
- Микродиссекция 145, 344, 345, 484
- Микроскопия люминесцентная 501-503, 509-510, 532, 536-537

- фазово-контрастная 497
- электронная 109 110, 463
- Микроманипуляции 141, 367, 372
- Микрометоды 362, 490, 492, 511
- Микроперестройки хромосом 59, 95, 322, 340, 484
- Микротрубочки веретена деления 61, 80, 83, 224
- Микрофтальм 272
- Микроцефалия 269, 279
- Микроядра 78, 93
- Миотомы 41
- Митоз 25, 28, 55, 59, 76-77, 82, 89, 93-95, 109, 126, 133-137, 146, 195, 209, 212, 216, 219, 229, 376-377, 381-382, 453, 460
- Многоводие 269-272
- Мобильные диспергированные элементы (МДГ) 211, 405
- Мозаицизм 217-219, 465
 - артефактный 133, 152, 158, 237, 346-347
 - генерализованный (истинный) 140-141, 198, 217, 223-224, 231, 236, 246, 319
 - гонадный 105, 113, 198-199, 206-207, 319
 - диплоидно-анеуплоидный 163
 - диплоидно-тетраплоидный 163,
 - диплоидно-триплоидный 160, 174, 217
 - критерии 142, 198, 230, 237-238, 241, 337
 - и однородительская дисомия 84, 97, 192, 234-236, 239-242, 339, 350
 - мейотический 83-84, 232
 - митотический 83-85, 232
 - межклеточный 217-218, 229
 - ограниченный 198, 217, 236, 246
 - ограниченный плацентой (ОПИ) 15, 84, 181, 192, 218, 234-239, 242-244, 255, 346, 348-349, 475, 482
 - плацентарный 85, 181, 221, 225-228, 232-233, 239-245, 255, 334, 346-348, 351
 - по половым хромосомам 174, 199, 227-232, 246, 255
 - псевдомозаицизм 140-141, 237, 346
 - соматический 197-198, 210
 - скрытый 198, 218, 230, 318
 - тканевой 198, 206, 218, 229, 246, 319
 - хромосомный 74, 83, 160-163, 181, 198, 206, 217-224, 230, 233, 238, 240, 244-245, 255, 280, 286, 318, 334, 337-339, 348, 351, 364
- Мозаики 161-163, 172, 197, 217-220, 228-232, 465-467, 544
- Моногенные болезни 100, 126, 139, 207, 210, 241, 248, 295, 321, 325-329, 351-364, 373-374, 410, 485
 - синдромы 248, 322
- Моносомия 73, 77, 80, 153, 161, 168, 174, 186-187, 226, 234, 346, 370, 479-482
 - аутосом 73, 162-163, 169, 174, 187, 190-191, 224, 254-256, 347, 479-482
 - митотическая 235
 - мейотическая 235
 - мозаичная 174, 200, 217, 226-229, 232-234, 246, 255, 348, 465
 - моносомия X 73, 161-165, 174, 180, 200-201, 228-229, 232-234, 241, 246, 255, 261-263, 266, 273, 280-284, 287, 313, 345-348, 370, 474, 479, 483
 - полная 229, 348
 - частичная 175, 181-183, 200, 345
- Морула 33-34, 220, 224-226, 245, 286, 333, 408, 413, 441, 443
 - поздняя 219, 225
- Муковисцидоз 115, 241, 296, 325, 327, 351, 356, 362, 364, 485

- Мутагены 59, 93-95, 176-177, 212, 215, 295, 485, 497
- Мутации генные 115-116, 144-145, 163, 248-249, 321, 327, 340, 481
- геномные (см. также Гетероплоидия) 55, 58, 71-76, 84, 100, 113, 144-145, 149-150, 159, 164, 167-168, 175-176, 179, 195, 206-209, 213-215, 219, 249-250, 254, 285, 308, 313, 317, 320, 328, 337-339, 343, 347, 357-360, 363
 - мейотические 80, 110
 - хромосомные (см. также Хромосомные перестройки) 55, 58, 71, 74-76, 85-95, 96, 100, 113, 145, 148-158, 164-167
- ### Н
- Нейропоры 21-22, 46
- Невынашивание беременности 66, 197-198, 239, 255-256
- привычное 78, 159, 184, 194, 239, 255-256, 327, 485
 - причины 256
- Неконтрастированный эстриол (НЭ) 291, 304-305
- Нерасхождение хроматид 76, 79, 234
- Нерасхождение хромосом 77-78, 128, 145-146, 151-157, 179, 195, 204-219, 228, 234, 317, 346, 485
- ахизматическое 79
 - в первом делении мейоза 79-84, 123, 147, 178-180, 233-234, 395, 427-428
 - в делениях дробления 83, 95, 180, 232, 236, 482
 - во втором делении мейоза 79-84, 124, 147, 157, 179, 233, 482
 - вторичное 80
 - двойное 80
 - истинное 78, 79
 - классификация механизмов 77
 - последовательное 80
 - постзиготическое 84, 180, 191, 210, 234, 465
 - простое 80
 - частота 152-153, 157, 179-180, 323, 464
- Нервная трубка, дефекты 252, 269, 304
- образование 41-42, 46, 51
- Нестабильность хромосом 210, 248, 412
- центромерных районов 402
- Нефротомы 41, 48
- Ник-трансляция *in situ* 60, 375, 414, 420-422, 513-515, 534-536
- с предобработкой ДНКазой 414, 417, 420-422, 435, 439, 451, 458, 469
 - с предобработкой рестриктазами 415-417, 420-421, 427-428, 433-435, 439, 451, 458, 469
- Ник-трансляционный сигнал, интенсивность флуоресценции 417, 421-425, 428-429
- локализация в хромосомных сегментах 414-428, 457-458
- Носовая кость 264
- агенезия 266
 - гипоплазия 266, 275
 - длина 266, 308
 - оссификация 251, 301
 - отсутствие визуализации 265-267, 316, 369
- Нуллисомия 73, 80, 156, 474, 480-482
- ### О
- Обмен взаимный 74, 98
- в центромерных районах 90-92
 - в дистальных районах 82
 - в субтеломерных районах 81
 - межхромосомный 74, 91, 108
 - проксимальный 82
 - фрагментами (сегментами) 74, 89, 91, 96-98, 182

- число 81, 88
 - Оболочка амниотическая 130, 225, 302, 332
 - блестящая 21, 30-31, 36
 - вителлиновая 32
 - слизистая матки 36
 - хориальная 49, 225, 302
 - ядерная 34
 - Овуляция 28-31, 41, 47, 121-122, 152-154, 176, 179, 213-214, 236, 486
 - Однородительская дисомия (ОРД) 74, 81, 84, 172, 191, 204, 215, 234-236, 239, 241-242, 323, 339, 342-343, 348-350, 411, 424, 473-474
 - гетерологичная (гетеродисомия) 84, 234, 474
 - и геномный импринтинг 204, 241, 345, 348-350, 475, 481-482, 488
 - изодисомия 85, 234
 - полная 85
 - сегментная 344-345, 410, 474-475, 545
 - Окадаевая кислота 126-127, 155, 464
 - Олигоспермия 104, 113-116, 159, 197, 202
 - Омфалоцеле 258-259, 265, 269-272, 276, 279-280, 287, 304
 - Онкогенез 245, 411-413, 469
 - Онкогены 245, 413, 459
 - Онкосупрессоры 412-413
 - Оогонии 25-28, 117-118, 155, 178-179, 213, 544
 - Ооциты 27-30, 35, 70, 73, 78, 83, 99-100, 109, 112, 117-127, 153-158, 161, 178-179, 186, 202, 209, 211-214, 224, 363, 372, 407, 410, 441, 471, 486
 - ооциты I 24, 25, 117, 118, 201
 - ооциты II 25, 92, 154, 181
 - неоплодотворившиеся 118, 123-125, 154-156
 - Оплодотворение 21-23, 26, 29-35, 72, 97-99, 110, 150, 157, 161, 176, 180, 184, 186, 190-191, 214-215, 304, 363, 382, 407, 461, 474, 481, 486
 - гетерологичное 111, 151-153, 187, 200, 207, 213
 - диспермное 159-160, 281, 410, 441
 - ошибки 76, 118, 123, 128, 159, 236, 281, 410
 - экстракорпоральное (*in vitro*) 111, 114, 118, 152-153, 363-365, 440, 487
 - Опухоли 214, 236, 297, 410-413, 425-426, 458
 - Органогенез 53, 66, 282, 330, 456
 - активный 20, 46, 49-52, 168, 285, 386, 392, 442-443, 454
 - поздний 41
 - ранний 20
 - Осификация 22, 251, 259, 266, 301
- ## II
- Партеногенез 118, 124, 236, 464, 479, 574
 - Пахитена 59, 70, 98, 102-110, 113, 117, 119, 188, 199, 211, 466, 544
 - Пенетрантность 267
 - Перинатальные потери 239, 242, 255-256
 - Персистенция (персистирование) 155, 244, 280, 283
 - Пиелэктазия 269-273, 276, 282, 302
 - Плацента 35, 58, 77, 84, 129-139, 142-143, 169, 172, 181, 205, 217-218, 225-226, 233, 237-245, 275-278, 281, 291-294, 300-305, 330-337, 341, 346-351, 361, 366-367, 371-373, 390, 397, 420, 423, 447, 468-470, 475, 482, 492, 496
 - аномалии 269-272, 284-285, 301, 478
 - дефинитивная 50-51, 226, 420, 426
 - межворсинковые пространства 275, 284
 - плодная часть 51

- развитие 347, 420, 458, 475
- строение 49, 50, 136, 284
- хорион-аллантаидная 51, 133, 384, 426, 451, 454
- формирование 47, 49, 50, 51, 137, 226, 239, 384, 426
- функции 133, 136-137, 305, 226, 239, 240, 285
- Плацентарная недостаточность 119, 139, 411, 475, 485
- Плацентарный барьер 133
 - диск 51
 - кровоток 49, 51, 143
 - мозаицизм (см. Мозаицизм плацентарный, Мозаицизм ограниченный плацентой)
- Плацентация 51, 255, 286, 457
- Плацентобиопсия 136, 291, 329-330, 337, 351-352
- Плейотропный эффект 267, 477, 481
- Плодное яйцо 36-37, 41, 46-47, 236, 255, 257
- Повторяющиеся последовательности ДНК сателлитные (см. также сат-ДНК) 62-63, 68-70, 392-393, 415, 426, 435, 438, 465, 517, 529
 - тандемные (КТП) 62, 146-147, 409
 - Alu 415, 418, 465
 - LINE 68, 70
 - SINE 68
- Полиморфизм (вариабельность) хромосом 64-67, 197
 - гетерохроматиновых районов 62, 194, 208, 424, 435, 445
 - структурный 107, 147, 341
 - функциональный ЯОР 63, 67, 377-380, 383-395, 398, 424, 457, 533
- Полиморфные (вариабельные) варианты хромосом 63-67, 207, 323
 - ДНК-маркеры 91, 147, 366, 475
 - локусы ДНК 145
 - размеры сегментов 65, 67, 340, 445
 - районы (участки) 66-67, 194, 208, 340, 395, 398, 504, 545
- 1qh 65-66, 69, 207, 417, 425-426, 439, 442, 447, 541
- 9qh 65-66, 69, 207, 323, 340, 417, 426, 438-439, 442, 445, 448, 541, 597
- 9ph 65, 66, 135, 165-166, 185, 194-196, 208, 340
- 16qh 66, 69, 207, 417, 425, 426, 439, 442, 448, 455, 541
- Yqh 65-66, 69, 207, 340
- Полиплоидизация 161, 163
- Полиплоидия (см. также Триплоидия, Тетраплоидия) 159-160, 163-165, 171, 174, 202, 219, 338
 - формы 160, 163, 174
 - частота 202, 218
- Полисомия 73, 80, 422
- Полиспермия 32, 76
- Половой бивалент 106, 188, 199
 - бугорок 22
 - диморфизм 24, 467
 - пузырек 70, 106, 200, 466
 - хроматин 58, 70, 131
- Половые гормоны 37, 179, 180
 - клетки (см. также Гаметы, Гонациты, Ооциты, Сперматоциты, Сперматозоиды) 23-28, 48, 54, 98, 101-106, 178, 206, 213-214, 406-408, 473, 485
 - органы 48, 200
 - признаки 201
 - пути 31, 332
 - тяжести 24
 - хромосомы (см. также Гоносомы, Хромосомы половые, X-хромосома, Y-хромосома) 58-61, 73, 81, 105, 148, 173, 188, 197-202, 217, 227-229, 232, 242, 246, 266, 323, 348, 430, 543
- Полярное тельце 123, 160
 - второе (ВПТ) 32, 78, 98-100, 118, 122-126, 155-158, 363, 464

- первое (ППТ) 30, 118, 122-125, 154-155, 363
 - Пороки развития 304, 343, 347, 387, 457, 478, 481, 488
 - врожденные (ВНР) 252-254, 265, 271, 286-288, 291, 295, 299-304, 321, 327, 358-361, 373-374, 483-485
 - изолированные 249, 252, 257, 267-270, 283, 289, 328, 359
 - корригируемые 259, 288, 299
 - несовместимые с жизнью 250, 280, 282, 302, 321, 387-388, 389
 - множественные (МВНР) 248-249, 252-253, 257, 267-270, 276, 280, 283, 286, 289, 296, 310, 321-322, 324, 327-328, 358-359, 373, 387, 443
 - нервной системы 307
 - сердца 359
 - совместимые с жизнью 250, 280, 302, 483
 - этиология 248-250, 252, 256, 268, 302, 321, 322, 475
 - Предделение (преждевременное разделение центромер) 78-79, 82, 127, 155, 219, 544
 - Преждевременная конденсация хромосом 155, 464, 544
 - Презклампсия 242, 305, 308
 - Провизорные органы 37, 84, 130, 162, 219, 224, 227, 272, 285-286, 417, 423, 461, 470, 478, 495
 - Пролиферация 372, 384, 413, 426, 449, 456, 458, 478
 - в условиях *in vitro* 58, 132, 237, 346
 - гоноцитов 213
 - клеток амниотической жидкости 139, 140, 346
 - хориона 132, 425, 426, 478
 - малигнизированных клеток 425-426
 - оогониев 24, 213
 - статус 84, 376-377
 - темпы 237
 - цитотрофобласта 51, 136-137, 384, 425-426, 456
 - Пронуклеусы 33-34, 98, 126, 128, 160, 382
 - женский 32-33, 112, 118, 124, 126, 128, 157, 382, 408, 442, 462, 464
 - мужской 33-34, 111, 118, 124, 126, 128, 151, 180, 382, 408, 442, 462, 464
 - Профаза мейоза 27-29, 70, 76, 82, 98-99, 101, 105, 108-109, 113, 117-119, 121, 182, 187, 192, 197, 208, 211, 544
 - Проэмбриональный период (см. также Гаметогенез, Сперматогенез, Оогенез) 20, 23, 54
 - Пузырек Графов 29, 30
 - желточный 39
 - зародышевый 28, 30, 118, 121-122
 - половой 70, 106, 200, 466
 - Пузырь амниотический 39
 - глазной 45-46, 496
 - двойной (double bubble) 258-259
 - мозговой 45-46
 - мочевого 22, 258
 - плодный 38, 242, 427
 - Пузырный занос полный 236
 - частичный 281, 284
 - Пуповина 38, 283-285, 301-302, 366, 492
 - единственная артерия 270-272, 302
 - пункция 143, 292-293, 329
 - сосуды 251, 269, 271, 283, 284
- Р**
- Разрывы 75, 85-86
 - в центромере 90, 92
 - в G-сегментах 192, 196

- в R-сегментах 192, 196
- изохроматидные 85, 90
- индуцированные 95, 211, 416, 418
- однокитовые 415, 418
- репарация 86, 211
- точки 86-88, 93-94, 186, 192-193, 215, 340-342, 543-545
- хроматидные 75, 85, 93, 95, 213
- хромосомные 75, 85, 89, 95, 152
- Районы хромосом 60, 63, 64, 146, 405, 415, 419-420, 423, 439, 443, 455, 457, 458, 464, 504-505, 533, 541
 - гетерохроматиновые 66, 69, 152, 181, 194, 207, 340, 349, 385, 402, 417, 424-427, 435, 438-439, 442-449, 454-457, 468-469, 502, 504
 - гиперметилированные 427-428, 442, 458
 - гипометилированные 424-425, 458
 - импринтированные 95
 - прицентромерные 62, 64, 69, 75, 90, 93, 151, 208, 278, 345, 381, 393, 424, 426-427, 431-436, 443, 455, 465, 504, 512
 - проксимальные 82, 394
 - субтеломерные 81
 - теломерные 62, 364, 464
 - эухроматиновые 67, 114
 - центромерные 62, 78, 91, 92, 146, 344, 504, 543
 - ядрышкообразующие (см. Ядрышкообразующие районы (ЯОР)) 63, 66-67, 71, 75, 152, 208, 345, 376-377, 385, 456, 464, 504, 533
 - CG-богатые 434
 - Xq11-q12 115
 - Xq24-27 422, 458
 - Yq11 114
 - 2q11-13 421, 422-423
 - 15q11-13 95, 394, 423-424, 437, 439, 458
 - 13q11 428
- Расщелины губы и неба 264, 269, 279
 - лица 265, 268, 270, 272, 279, 281, 287, 301
- Реакция акросомная 26, 31
 - капацитации 31
 - кортикальная 32
 - полимеразная цепная (ПЦР) 114, 126, 129, 146, 148, 198, 229-231, 276, 295, 318, 326, 353, 362, 364, 366, 368, 370
 - количественная полимеразная (QF-PCR) 143, 147, 370-371
- Rh (резус) 325-326, 328-329, 368, 371
- Рекомбинация 80, 82, 83, 98, 117, 145-146, 179, 182, 192-193, 196, 211-212, 215-216, 392, 393, 419, 466
 - гомологичная 98, 99
 - митотическая 474
 - негомологичная 393
 - ошибки 96
 - подавление 81, 193
- Реметилирование 407
- Репликация асинхронная 59, 406, 449-451, 455
 - вилки 453
 - время 67-68, 451-455
 - ДНК 85, 160, 380
 - и метилирование 376, 280, 381, 400-401, 405
 - инициация 392, 451-452
 - и хромосомные аномалии 77, 85, 88, 93, 95, 222
 - модели 455, 456
 - ошибки 160
 - поздняя 68, 203
 - порядок 450, 451, 456
 - ранняя 68, 450, 453-454
 - раунды 77, 95, 401
 - сегментов хромосом 450-451, 453-455
 - синхронная (одновременная) 449, 454-455

- терминация (завершение) 83, 222, 449
 - хромосом 34, 144, 336, 376, 449-450, 453
 - Рестрикция 415-417, 444, 465, 534-535
 - *in situ* 375, 414
 - Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) 68, 414-417, 419, 425, 433, 439, 444, 457, 465, 535
 - Ретротранспозоны 412, 471, 489
 - рДНК (см. также Рибосомные гены)
 - рДНК-зонд 345, 377, 390, 522
 - транскрипция 376, 379-381, 385, 392-393
 - Рибосомные гены (*p*-гены), активные 60, 204, 375, 377, 379-386, 389, 391, 393-394, 397-398, 424, 457, 464
 - кластеры 63, 344-345, 377-378, 380, 382, 385, 390-393, 396, 424, 457, 464
 - локализация 63, 345, 379, 380, 384, 392, 435, 464, 533
 - «молчащие» 379, 385
 - репрессия 381, 385, 393, 457
 - число копий 63, 208, 377-380, 382, 391, 386, 397, 398, 424
 - Риск диагностических ошибок 142, 346, 347
 - наследственных и врожденных болезней 100, 289, 290, 296, 298-301, 303-305, 321, 325-326, 340, 342, 345, 351-354, 364, 368, 373, 388
 - неблагоприятных исходов беременности 242
 - невынашивания беременности (спонтанных аборт) 66, 186, 200, 242
 - однопородительской дисомии 342
 - пороговый (*cut off*) 305, 307, 313-314
 - послеоперационных осложнений 140, 307, 308, 330, 366-367
 - хромосомных болезней 166-167, 177, 179-182, 186, 190, 195-196, 200, 204, 206, 210, 239, 261-262, 267-268, 271, 273, 291, 303-305, 307-308, 310-317, 319-324, 327-329, 352, 359-360, 368-369, 371, 374, 387-390, 483
 - РНК 470, 476, 478
 - малые интерферирующие 466, 477
 - малые цитоплазматические 420
 - малые ядерные 477, 488
 - материнская 35
 - рибосомные (см. рРНК)
 - транскрипты 409-410, 467
 - рРНК 63, 376
 - гены 379, 381, 384, 392-395, 398
 - про-рРНК 376
 - субъединицы 376
 - РНК-полимераза 376-377, 469
- С**
- сатДНК (см. также ДНК сателлитная)
 - класс I 69, 426
 - класс II 69, 426
 - класс III 69, 426, 435, 438
 - α -сатДНК 69
 - β -сатДНК 69, 435, 438
 - γ -сатДНК 69
 - Сегментация хромосом
 - Q-сегментация 541
 - G-сегментация 542, 546
 - M-сегментация 429-430, 436, 439-441, 443, 459, 470
 - R-сегментация 542
 - Сегменты (блоки, диски) хромосом 63, 65, 67, 70, 86, 94, 95, 98, 419, 434, 435, 436, 437, 441, 450-452, 454, 458, 543
 - обогащенные AT-парами 62, 68, 69, 418
 - обогащенные CG-парами 62, 68, 69, 418

- С-сегменты 62, 430, 446-447, 450, 453, 542
- Н-сегменты 541
- G-сегменты 62, 67, 69, 70, 192, 196, 336, 340, 403, 417, 419, 430, 434, 439, 450, 453-454, 455
- Q-сегменты 62, 446-447, 541
- М-сегменты 430, 433, 436, 439-440, 470, 541
- R-сегменты 62, 69, 192, 196, 417-419, 423, 428, 430-434, 436, 450, 453
- Т-сегменты 417-419, 430-433, 436
- Сегрегация аномальная 77-78, 80-81, 84-85, 123, 128, 157, 160, 176, 178, 196, 199, 207, 208, 210-211, 215, 220, 222, 225, 228, 234, 236, 238, 395
 - бивалентов 82
 - совместная (смежная) 182-183, 187
 - унивалентов 78-80
 - хроматид 79, 464
 - хромосом 79, 81, 83, 89, 127, 163, 176, 182-186, 190, 194, 196, 206-209, 323, 342
 - чередующаяся (альтернативная) 183, 187-188
 - 3:1 182-183, 185
- Селекция презиготическая гамет 83, 95, 106, 111, 121, 150, 180, 184, 186, 196, 209, 214, 215
 - постзиготическая зигот 83, 150, 184, 224-226
- Сестринские хроматиды 76-79, 88, 91, 122, 127, 452
- Сестринские хроматидные обмены (СХО) 135, 210, 441, 441, 443, 450, 465, 544
- Сингамия 34
- Синдромы делеционных 94-95
 - дупликационные 95
 - кольцевых хромосом 94
 - микрохромосомные 95, 322, 484
 - моногенные 248-249, 321
 - нехромосомные 248-249, 321
 - с неуточненным типом наследования 248
 - с хромосомной нестабильностью 210
 - тяжесть проявления 228, 241, 249, 258-259
 - хромосомные 199, 217, 228, 246, 248-249, 252, 275, 280, 284, 286, 304, 321, 394
- Синцитий 38, 49, 130, 137, 277, 284
- Синцитиотрофобласт 129, 133, 137, 139, 426, 456
- Склеротом 46
- Сомиты 21-22, 41-42, 48, 51
- Сосуды желточного мешка 47
 - кровеносные 49-50, 130
 - магистральные 46-47, 251, 257-258, 263, 271, 283
 - первичные 21
 - плаценты 49-50
 - пуповины 38, 49, 251, 284
 - эндометрия 37
- Спейсеры 376, 380, 392-393, 477
- Сперматогонии 24-25, 101, 113, 199, 207, 407
- Сперматоциты 59, 76, 83, 98-101, 106-109, 113, 127, 197, 199, 202
 - сперматоциты I 25, 99, 102-105, 108, 466
 - сперматоциты II 25, 102-105
 - зякулированные 101, 104, 107
- Сперматиды 25-26, 98, 102-105, 159, 199, 213
- Сперматозоиды 24-26, 31-34, 73, 76, 82, 99-102, 105, 110-113, 151, 153, 209, 213, 214, 317, 382, 519, 522
 - анеуплоидные 151-152, 180, 202
 - гипергаплоидные 153
 - гипогарплоидные 152
 - диплоидные 76, 110, 199, 200, 236

- дисомные 199-200, 207
- несбалансированные 182, 187, 188, 190, 193
- полиплоидные 202
- сбалансированные 182, 187, 188
- X-несущие 151, 202
- Y-несущие 151, 202

Спермиогенез 24, 26, 100, 105

Спланхнотом 41, 46

Спутники 61-67, 204, 340, 393, 424, 435, 475, 544

- двойные 63
- увеличенные 65

Спутничные нити 61, 63, 65, 424

СрG-динуклеотиды 399-403, 411, 466

- метилирование 399, 401, 405, 410, 417, 434
- распределение в геноме 399-400, 434-435

СрG-островки 68, 400, 414, 416, 419

- метилирование 411, 434, 470

Сравнительная геномная гибридизация (CGH) 129, 144, 162, 254, 344

Субсегменты хромосом 63, 419, 543

Супрессия 405-406

Т

Теломеры 62-63, 81, 88, 340, 364, 464, 545

Телофаза 59, 129, 376, 382

Терапия генная 371-373, 488, 489

- клеточная 365, 371-373, 489
- симптоматическая 487, 489
- сохраняющая 361
- химиотерапия 180, 213
- хромосомных болезней 486-489

Тератогены 52-53, 248, 295-297, 321

Тератома 227, 236, 265, 280

Тетраплоидия 73, 76, 77, 160, 168, 174, 347

Тимидин 134, 449, 453, 507, 508, 511

Тимин 399-400

Ткань децидуальная 307

- костно-хрящевая 266
- мозга 277
- соединительная 37, 50, 201

Ткани культивируемые 218

- мацерированные 133
- активно пролиферирующие 334, 372
- экстраэмбриональные 175, 218, 239, 241, 426, 448, 456, 458
- эмбриональные 24, 48, 58, 133, 225, 384, 425, 458
- гонад 144, 199, 201, 207

Толщина воротникового пространства 251, 258-263, 267, 268, 308, 316, 363, 369, 373-374

Транслокации нерцепрокные 74

- реципрокные 74, 89, 94, 148, 182-185, 188, 195, 323, 324, 338, 339, 342
- Робертсоновские (см. также Центрические слияния хромосом) 75, 92, 93, 148, 185-192, 195, 215, 234, 338, 339, 342, 397, 475, 482
- сбалансированные 76, 85, 105

Транспозоны 412, 443, 471, 489

Триваленты 120, 186-188, 200, 544

Триплоидия 73, 76, 94, 120-121, 128, 159-160, 163, 165, 174, 178, 180, 228, 261, 265, 269, 272-273, 281-284, 304, 313-314, 347, 441, 443

- мозаичные формы 84, 160, 163, 174, 217, 228, 347

Трисомии 73, 77, 82-83, 123, 146, 153, 161, 165, 175, 184, 186, 206, 214, 217-218, 224, 226, 228, 232, 240, 242, 245, 254-255, 261, 263, 285, 318, 348, 359, 370, 396-398, 427, 429, 465, 478, 482

- аутосомные 162-163, 169, 170-173, 180, 224, 263, 280
- двойные 164-165, 173
- коррекция 234-235
- летальные 170-175
- множественные 73

- мозаичные 170-175, 228, 232, 234, 240, 346-348
 - половых хромосом 81, 173, 228, 242, 255, 280, 318
 - сублетальные 172-173, 241, 398
 - частичные 76, 175, 182, 183, 345, 476
 - Трисомия 1 (Тс1) 169-170, 171, 234, 255
 - Трисомия 2 (Тс2) 165, 170, 171, 232, 234, 240, 255, 349
 - Трисомия 3 (Тс3) 170, 171, 232, 234, 240
 - Трисомия 4 (Тс4) 162, 170, 171, 234, 349
 - Трисомия 5 (Тс5) 170, 171, 232, 234, 349
 - Трисомия 6 (Тс6) 162, 165, 172, 234, 348, 349
 - Трисомия 7 (Тс7) 165, 170-172, 175, 232, 234, 348, 349
 - Трисомия 8 (Тс8) 170-172, 208, 232, 234, 242
 - Трисомия 9 (Тс9) 162, 165, 170, 171, 232, 234
 - Трисомия 10 (Тс10) 171, 232, 234
 - Трисомия 11 (Тс11) 165, 171, 234, 348, 349
 - Трисомия 12 (Тс12) 171, 232, 234, 242
 - Трисомия 13 (Тс13) 171, 172, 175, 178, 180, 184, 190, 232, 234, 241, 255, 260-267, 279, 282-284, 287, 313, 318, 370, 394-398, 428, 443, 457, 474, 483
 - Трисомия 14 (Тс14) 171, 172, 184, 191, 234, 348, 349
 - Трисомия 15 (Тс15) 165, 171, 172, 191, 232, 234, 254, 255, 349
 - Трисомия 16 (Тс16) 165, 171, 172, 178, 180, 232, 234, 240, 254, 313, 348, 349, 427, 428, 443
 - Трисомия 17 (Тс17) 171, 172, 234
 - Трисомия 18 (Тс18) 118, 121, 165, 171, 172, 175, 178, 180, 195, 232, 234, 241, 255, 260-278, 282, 284, 285, 287, 307, 313, 318, 370, 394, 474, 483
 - Трисомия 19 (Тс19) 169, 171, 234, 255
 - Трисомия 20 (Тс20) 165, 171, 172, 175, 232, 234, 348, 349
 - Трисомия 21 (Тс21) 97, 119, 121, 173, 175, 178, 180, 184, 190, 191, 197, 198, 208, 209, 228, 232, 234, 255, 259-267, 270, 273-78, 282, 284, 307, 311-319, 320, 359, 360, 370, 394-398, 457, 474, 483
 - Трисомия 22 (Тс22) 162, 171, 173, 175, 190, 232, 234, 254
 - Трисомия X (Трипло-X) (см. также Кариотип 47,XXX) 173, 180, 200
 - Трофобласт 21, 34-39, 77, 129, 137, 172, 226-227, 236, 239, 277, 330
 - инвазия трофобласта 35, 161, 244
 - и хромосомные аномалии 161, 170, 172, 220, 221
 - полиплоидизация 161, 163
 - дифференцировка 35-38, 129, 220, 221, 227, 244
 - Трофэктодерма 35, 37, 118, 225-226
 - дифференцировка 219, 225, 408
 - инактивация X-хромосомы 410, 467
 - метилирование ДНК 417
 - обособление 219
 - производные 130, 237, 467
- У**
- Узелок Гензеновский 38
 - Укорочение верхней челюсти 266
 - носовых костей 266
 - синаптонемного комплекса 109
 - трубчатых костей 269-274, 280, 287, 302
 - Ультразвуковые маркеры хромосомной патологии (УЗМ) 251-253, 266-268, 273, 324, 328, 360

- в I триместре беременности 251, 259, 265-268, 316
- во II триместре беременности 251, 266, 268-273, 278, 281, 283, 284, 302
- изолированные 253, 270, 273-274, 276
- сочетанные 253, 270, 273-274, 277
- транзиторные 252, 280
- Униваленты 110, 119-122, 179, 197, 544
 - образование 78-79, 83, 200
 - сегрегация 78-79
- Утолщение (избыточность) шейной складки 269-274, 276, 284

Ф

- Факторы азооспермии (AZF) 117
 - анеуплоидии 206
 - возрастные 176, 312, 316, 319
 - биологические 152, 176, 212
 - генетические 100, 177, 206-212, 216, 249, 256, 323
 - декапитации 31
 - множественные 96, 108, 111, 176, 177, 242, 248, 256, 271, 299, 321, 379
 - мутагенные 93, 177, 215
 - регуляции активности генов в развитии 462, 469, 472, 488
 - специфические мейотические 110-111, 119, 126
 - транскрипции 41, 375, 376, 377, 380-382, 400-403, 420, 466, 467, 476, 477, 479, 488
 - цитоплазматические 212
 - экзогенные (внешней среды) 52, 54, 176, 180, 213-216, 286, 297-299, 402, 413, 481, 486
 - эндогенные 177, 179, 288, 299, 413
 - эпигенетические 229
- Фетопатии 250, 286

- Фолликулы 29, 30, 121, 176
 - антральные 99, 178
 - атретические 213
 - примордиальные 28, 201, 213
- Фрагменты хромосомные 74-75, 85, 89-90, 93, 97-98, 145, 196, 201, 204, 206, 215, 216, 370, 444, 468, 474, 476, 481, 488
 - ацентрические 148, 152
 - ДНК 62, 370, 418
 - зародышевых листков 227
 - плодных оболочек 227

Х

- Хаотичный набор хромосом 226, 227
 - рост тканей 236
- Хиазмы, визуализация 98, 99, 108
 - дистальные 81,
 - локализация и число 81, 108, 179, 182
 - проксимальные 81-82
 - теломерные 82
 - и МДГ 211
- Химера 346, 372, 479, 486, 543
- Химеризм 74, 227, 228, 346, 465
- Хорион 35, 58, 84, 142
 - Ворсинчатый 93, 130, 132, 137, 333
 - ворсины 38, 43, 49, 130, 132, 136, 237, 336, 337
 - мезенхима 47, 49, 50, 225, 237
 - образование и дифференцировка 37, 129-130, 219, 226, 236, 283, 384, 420, 426, 451, 454
 - пролиферативный потенциал 426
 - развитие 38, 43, 47, 49, 50, 51, 427
 - рамификация 133
 - строение 50-51, 133, 136, 278, 281, 284, 354, 425
 - старение 130

- цитотрофобласт 57, 77, 130, 138, 147, 237, 333, 425, 426, 449
 - Хорионамнионит 292
 - Хорионбиопсия 131, 227, 291, 315, 329, 330, 332, 352, 368
 - Хорионический гонадотропин (ХГЧ) 35, 137-139, 243-244, 291, 294, 304-308, 316, 369, 373-374
 - Хорионэпителиома 236
 - Хроматин активный 400, 404, 414, 416-419, 451, 463, 471
 - деконденсация 113, 382
 - конденсация 70
 - конформация 110, 380, 394, 404-406, 414, 422
 - неактивный (инертный) 399, 402, 467
 - половой 58, 70, 131
 - ремоделирование 381
 - стабилизация 404, 418
 - структура 380-381, 403-404, 415, 450
 - типы 67
 - Хромомеры 106
 - Хромосомные перестройки внутрихромосомные 74-75, 90, 343
 - делеции (см. Делеции хромосомные)
 - дубликации (см. Дубликации хромосомные)
 - изохромосомы 75, 90, 91, 94, 148, 152, 191, 234, 342, 343, 544
 - инверсии (см. также Инверсии) 75-76, 85-87, 90, 94, 185, 192-194, 338-340, 505, 544
 - инсерции 75-76, 87, 94, 544
 - кольцевые хромосомы 75, 88, 93, 94, 95, 153, 544
 - маркерные хромосомы (см. также Маркерные хромосомы) 59, 75, 93, 152, 153, 175, 203, 204, 342, 343-345, 351, 544
 - межхромосомные 74-75, 86-87, 90-91, 93, 96, 108, 343, 466
 - транслокации (см. также Транслокации) 74, 91, 105, 122, 127, 153, 177, 210, 364, 461, 474, 479, 544-545
 - Хромосомы акроцентрические 61, 63, 81, 92-94, 188, 190, 208, 340, 343, 376, 379, 385, 398, 392, 392, 393, 395, 424, 426, 430, 435, 504, 533
 - метацентрические 61, 75, 92
 - субметацентрические 61, 152
 - Хромоцентры 122
- Ц**
- Центрические слияния хромосом 90-94, 186-188, 190, 192, 215, 475
 - Центромера 69, 80, 86, 89, 90, 91, 183, 543
 - локализация 61, 63, 75
 - деление 90, 155
 - функциональная 93
 - Цитозин 400, 415
 - метилированный 399, 403, 405, 429, 434 (см. также 5-метилцитозин)
 - Цитотрофобласт (см. также клетки Лангханса) 40, 50, 129-132, 169, 170-174, 220-222, 225, 232, 237, 240, 245, 276, 278, 285, 333-337, 346, 351, 383-386, 390-393, 396, 418, 423-428, 435, 439, 442, 444-445, 448-449, 452-458, 471, 517
 - пролиферация 51, 133-139, 416
- Э**
- Экспрессия, активизация 136, 426
 - дифференциальная 472, 475
 - в мейозе 82
 - регуляция 241, 399, 402, 466-468, 473, 477

— моноаллельная 406, 408-410, 423-424, 467, 473
— в эмбриогенезе 127, 438, 442, 459, 487
— *p*-генов 63, 378-386, 389, 392-393, 397, 399, 457, 464
— тканеспецифичных генов 405, 438
Эмбриобласт 34-35, 38, 225-226, 364, 471
Эмбриолетаи 254
Эмбриопатии 257, 286
Эндомитоз 76-77, 347
Эндоредупликация 77, 543
Эпигенетическая изменчивость 399, 402
— наследственность 405,
— регуляция функции 399
Эпигенотип 408, 474
Эпителий амниотический 130, 134, 139, 140, 237
— буккальный 58, 144, 218, 230, 231, 511, 517
— кишечный 279, 416
— маточных желез и матки 36, 37, 49
— фолликулярный 27
— хориальный 137, 517
— целомический 24, 42
Эстриол 291, 304, 305
Эухроматин 67, 69, 70, 345, 400, 426, 468

Эффект межхромосомный 184, 202
— положения 380, 381, 385

Я

Ядерное доминирование 393
Ядрышко 122, 208, 376-377
Ядрышкообразующие районы (ЯОР) 63, 66, 71, 152, 456
— аргентофильные 63, 345, 376, 377, 378, 382, 464
— делеции 75
— Дупликации (двойные ЯОР) 208
— полиморфизм 67, 349, 377-378, 382, 385-386
Ядрышкообразующие хромосомы 152, 208, 379, 395
— ассоциации 208, 276, 393
Яйцеклетка (см. также Ооциты) безъядерная 236
— донорство 201
— овуляция 30-31, 121, 152, 176, 214, 372
— оплодотворение 25, 32, 76, 95, 99, 111, 117, 123-126, 156, 159, 161, 186, 187, 199, 236, 363, 406, 461
— созревание 29, 32, 76, 214, 485, 486
— старение 178

Научное издание

**Владислав Сергеевич Баранов
Татьяна Владимировна Кузнецова**

ЦИТОГЕНЕТИКА ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

ООО «Издательство Н-Л»
Генеральный директор – В.Г. Родин
Выпускающий редактор – М.Л. Короткова
Корректор – О.Е. Ларионова
Верстка – С.А. Тульцев

Подписано в печать 01.12.2006 г.
Формат 60 x 90 1/16.
Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. . Тираж экз.

Оригинал-макет и печать – «Издательство «Левша. Санкт-Петербург»
197376, Санкт-Петербург, Аптекарский пр., 6,
тел. (812) 234-54-36, тел./факс (812) 234-13-00
e-mail: levsha@levshaprint.ru
www.levshaprint.ru

По вопросам приобретения издания обращаться в ООО «Издательство Н-Л»
198152, Санкт-Петербург, ул. Автовская, д. 17, оф. 5а
Тел.: +7 (812) 784-97-51; +7 (812) 784-83-82
E-mail: nl@n-l.ru

ISBN 5-94869-034-2



9 785948 1690346