

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр»**

На правах рукописи
УДК [616.697+616.69-008.6]: 575.224.232.5

ЧЕРНЫХ Вячеслав Борисович

**АНОМАЛИИ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ
ПРИ НАРУШЕНИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА
И РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА**

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Специальность: 03.02.07 – генетика

Научный консультант:
Доктор биологических наук,
профессор Курило Л.Ф.

МОСКВА, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		6
ВВЕДЕНИЕ		8
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ		16
1.1. Морфогенетические и генетические аспекты дифференцировки пола и развития половой системы у человека		16
1.1.1.	Морфогенез и развитие мочеполовой системы у человека	16
1.1.2.	Генетическая детерминация и дифференцировка пола у человека	25
1.1.3.	Генетическая регуляция развития репродуктивной системы у человека	26
1.2.	Гаметогенез у человека: сперматогенез и оогенез. Митоз и мейоз	33
1.3.	Половые хромосомы человека, их аномалии и роль в формировании пола и репродуктивной функции	36
1.3.1.	X-хромосома человека. Инактивация хромосомы X	37
1.3.2.	Псевдоаутосомные (PAR) регионы человека, области X-Y гомологии	40
1.3.3.	Y-хромосома человека	44
1.3.4.	Ген <i>SRY</i>	46
1.3.5.	Локус <i>AZF</i> ('фактор азооспермии')	46
1.3.6.	Полиморфизм Y-хромосомы	48
1.3.7.	Рекомбинация половых хромосом и механизмы образования их структурных перестроек	49
1.4.	Аномалии половых хромосом	50
1.4.1.	Численные аномалии половых хромосом	51
1.4.2.	Гonosомный мозаицизм. Изодисомия по половым хромосомам	52
1.4.3.	Химеризм	53
1.4.4.	Структурные аномалии половых хромосом	54
1.4.5.	Микроструктурные перестройки половых хромосом	61
1.5.	Клинические аспекты нарушений развития и/или функции репродуктивной системы, связанных аномалиями с гоносом	68
1.5.1.	Синдром Клайнфельтера и его варианты	69
1.5.2.	Синдром 47,XYУ-мужчина (дисомия Y)	71
1.5.3.	Трисомия X	72
1.5.4.	Синдром Шерешевского-Тернера	73
1.5.5.	Мозаицизм X/XY и его варианты	74
1.5.6.	XX-инверсия пола (46,XX тестикулярная форма НПФ	77
1.5.7.	Овотестикулярная форма НПФ (истинный гермафродитизм)	78
1.5.8.	XX-дисгенезия гонад.	80
1.5.9.	XY-дисгенезия гонад	81
1.5.10	Синдром тестикулярной дисгенезии	84
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ		86

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		
2.1.	Характеристика выборки обследованных пациентов	86
2.2.	Общеклинические методы	88
2.3.	Спермиологическое исследование	88
2.4.	Гистологическое исследование биоптатов гонад	89
2.5.	Стандартное цитогенетическое исследование	90
2.5.1.	Культивирование лимфоцитов периферической крови	90
2.5.2.	Приготовление препаратов метафазных хромосом и интерфазных ядер	90
2.5.3.	G(GTG) окрашивание хромосом	91
2.5.4.	C(CBG) окрашивание хромосом	91
2.5.5.	Принцип анализа хромосомных препаратов	92
2.6.	Молекулярно-цитогенетическое исследование	92
2.6.1.	Принцип на соматических клетках анализа флуоресцентных сигналов после проведения флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i>	94
2.6.2.	Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> на ядрах сперматозоидов	94
2.7.	Молекулярно-генетическое исследование	96
2.7.1.	Выделение геномной ДНК	96
2.7.2.	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	97
2.7.3.	Анализ локуса SRY	98
2.7.4.	Анализ последовательностей короткого плеча Y-хромосомы	99
2.7.5.	Анализ последовательностей длинного плеча Y-хромосомы	100
2.7.6.	Электрофорез в полиакриламидном геле	101
2.7.7.	Анализ QF-PCR (количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция, КФ-ПЦР)	102
2.7.8.	Анализ мутаций гена <i>SOX3</i>	103
2.7.9.	Исследование CAG-повтора экзона 1 гена рецептора андрогенов (<i>AR/HUMARA</i>) и анализ инактивации хромосомы X	104
2.8.	Статистические методы	105
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ		106
3.1.	Частота хромосомных аномалий у пациентов с нарушением репродукции	106
3.2.	Цитогенетическое и молекулярное обследование пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера и его вариантами	111
3.2.1.	Цитогенетическое обследование пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера.	111
3.2.2.	Молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера.	117
3.3.	Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов мужского пола со	

	структурными перестройками Y-хромосомы и/или X/Y мозаицизмом, не имеющих гоносомных синдромов	129
3.4.	Цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с кариотипом 46,XX/46,XY	143
3.5.	Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с “чистой” формой XY-дисгенезии гонад	163
3.6.	Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с XX-дисгенезией гонад	171
3.7.	Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с овотестикулярной формой нарушения формирования пола	187
3.8.	Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с анорхией и монорхией	193
3.9.	Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с XX-инверсией пола.	200
3.10.	Анализ мутаций гена SOX3 у пациентов с XX-инверсией пола и пациентов с овотестикулярной формой нарушения формирования пола	220
3.11.	Картирование точек разрыва в Y-хромосоме у пациентов с цитогенетически идентифицированными несбалансированными и микроструктурными перестройками половых хромосом	223
3.11.1.	Картирование точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы	223
3.11.2.	Картирование точек разрыва в длинном плече Y-хромосомы	231
3.12.	Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с синдромом Клайнфельтера	237
3.13.	Исследование гена андрогенового рецептора (AR) и инактивации X-хромосомы у пациентов с синдромом Клайнфельтера и пациентов с 46,XX тестикулярной формой НФП (синдромом ‘46,XX-мужчина’)	242
3.14.	Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследования пациентов с дисомией или полисомией Y	252
3.15.	Молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование мужчин с аутосомно-гоносомными транслокациями	261
3.16.	Молекулярный анализ Y-хромосомы у мужчин с нарушением репродуктивной функции и сбалансированными перестройками аутосом	270
3.17.	Исследование частоты и спектра структурных аномалий Y-хромосомы у мужчин с бесплодием	276

3.18.	Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с перичентрическими инверсиями хромосомы Y	285
3.19.	Анализ микроделечий Y-хромосомы у пациентов с гетероморфизмом длинного плеча Y-хромосомы или подозрением на цитогенетические Yq делеции	289
3.20.	Исследование частоты и выраженности гоносомного мозаицизма при различных гоносомных синдромах и мутациях с вовлечением Y-хромосомы или ее материала	291
3.21.	Исследование нарушений сперматогенеза, мейоза и частоты анеуплоидии в сперматозоидах у пациентов с различными мутациями половых хромосом	296
3.22.	Исследование частоты анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с аномалиями половых хромосом в кариотипе	
3.22.1.	Исследование частоты анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с аномалиями половых хромосом в кариотипе	305
3.22.2.	Исследование частоты анеуплоидии по аутосомам в сперматозоидах у мужчин с числовыми или структурными аномалиями половых хромосом	311
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		315
ВЫВОДЫ		338
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ		342
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		345
Приложения		397

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМГ – антимюллеров гормон;
- Б1 – первичное бесплодие;
- Б2 – вторичное бесплодие;
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИГ – истинный гермафродитизм (овотестикулярная форма НФП);
- ИСК – извитые семенные канальцы;
- КА – количественный кариологический анализ;
- М1 – первое мейотическое деление;
- М2 – второе мейотическое деление;
- м.п.н. – миллион пар нуклеотидов;
- МПА – мультиплексная амплификация;
- НПК – незрелые половые клетки;
- НФП – нарушение формирования пола;
- п.н. – пар нуклеотидов;
- ПААГ – полиакриламидный гель;
- ПГД – преимплантационная генетическая диагностика;
- ПНБ – привычное невынашивание беременности;
- ПК – половые клетки;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- МПА – мультиплексная амплификация (мультиплексная ПЦР);
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- СДГ – смешанная дисгенезия гонад;
- сз – сперматозоид(ы);
- СК – синдром Клайнфельтера;
- СКС – синдром “только клетки Сертоли”, сертоликлеточный синдром (SCOS, Sertoli Cells Only Syndrome);
- СПНЯ – синдром преждевременной недостаточности яичников;
- СТД – синдром тестикулярной дисгенезии (тестикулярный дисгенез);
- СШТ – синдром Шерешевского-Тернера;
- т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;
- УГС – урогенитальный синус;
- ХА – хромосомные аномалии;
- ЭДТА – натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;
- ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение;

AMELX/AMELY – пара X-Y гомологичных локусов гена амелогенина и его Y-копии (псевдогена), локализованных на хромосомах X и Y, соответственно;

AR – ген андрогенового рецептора (*androgene receptor, HUMARA*), локализованный на длинном плече хромосомы X человека (локус Xq12);

AZF – Azoospermia Factor, “Фактор Азооспермии” - участок Y-хромосомы, располагающийся в Yq11.21-23, делеции которого являются причиной нарушения сперматогенеза и (секреторной) азооспермии и лигозооспермии тяжелой степени;

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindol) в фенилендиаминдигидрохлориде, контрастирующий краситель;

DAZ – Deleted in Azoospermia – “делетированный при азооспермии” - название генного семейства, расположенного в субрегионе AZFc;

dNTP – диоксинуклеозид-трифосфат(ы);

FISH – флюоресцентная гибридизация на препарате (*fluorescence in situ hybridization*);

ICSI – Intracytoplasmic Sperm Injection, метод искусственного оплодотворения путем введения сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки

MSY – Male specific region of the Y chromosome – участок Y-хромосомы человека, в норме не участвующий в X-Y рекомбинации;

PAR1 – псевдоаутосомный регион (район) 1, располагающийся в дистальной части коротких плеч хромосом X и Y (pseudoautosomal region 1);

PAR2 – псевдоаутосомный регион (район) 2, располагающийся в дистальной части длинных плеч хромосом X и Y (pseudoautosomal region 2);

PBS – фосфатный буфер: 1мМ KH_2PO_4 + 154мМ NaCl + 5.6 мМ Na_2HPO_4 ;

SDS – додецилсульфат натрия;

SSC – натрий цитратный солевой буфер (*saline-sodium citrate buffer*) натрий цитратный солевой буфер (*saline-sodium citrate buffer*);

SRY – Sex-determining Region Y – Y-сцепленный ген, контролирующий дифференцировку тестикул и детерминирующий мужской пол;

STS – разновидность ДНК-маркеров (*sequence-tagged-site*), используемая для детекции определенной последовательности ДНК/локуса хромосомы;

TBE – трис-боратный буфер: 89 мМ трис-борат + 89 мМ борная кислота +2 мМ ЭДТА;

TE – солевой буфер: 10 мМ трис-HCl, pH 8.0 + 1 мМ ЭДТА.

XTR – X-translocated region ('PAR3') – X-Y гомологичная область в хромосоме X (локус Xq21.3) и хромосоме Y (локус Yp11.2) человека.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Исследование роли генетических факторов в этиологии различных форм нарушения детерминации пола, развития и функционирования репродуктивной системы у человека является приоритетной областью репродуктивной медицины и одним из наиболее активно развивающихся направлений современной биологии, генетики и медицины. Важность исследований в данной области обусловлена рядом причин. Аномалии формирования пола занимают третье место в структуре пороков развития у человека [Курило и др., 2000; Курило, 2007]. Пациенты с нарушением развития органов половой системы нуждаются в оперативном лечении, гормональной терапии, психологической помощи. Помимо затрат на их лечение, реабилитацию и социальную адаптацию, у большинства пациентов с нарушением формирования пола прогноз в отношении репродуктивной функции остается неблагоприятным [Осипова, 1997; Козлова, Демикова, 2007]. Актуальность исследований этиологии и патогенеза нарушения репродукции в значительной мере связана и с высокой частотой бесплодия, отмечаемое у 18-20% супружеских пар [Cram et al., 2001]. От одной трети до половины случаев причину бесплодия установить не удается – идиопатическое бесплодие или бесплодие неясной этиологии [Crosignani et al., 1992; Nieschlag, 1997]. Генетические исследования последних лет убедительно свидетельствуют, что значительная часть нарушений формирования пола и полового развития, а также тяжелых форм нарушения репродукции, ‘идиопатического’ бесплодия, привычного невынашивания обусловлена генетическими факторами.

Мутации половых хромосом (гоносом) занимают ведущее место, как среди генетических причин формирования пола, так и причин мужского и женского бесплодия. Частая встречаемость гоносомных мутаций у пациентов с нарушением репродуктивной системы обусловлено с одной стороны – богатым содержанием хромосомами X и Y генами, контролирующими развитие и функцию репродуктивной системы, а с другой высокой частотой рекомбинаций и мутаций в системе половых хромосом [Кулешов, 1979; Nielsen, Wohlert, 1991; Лебедев, 2012; Gardner, Sutherland, 2012]. Примерно у 30% пациентов с нарушением полового развития выявляют мутации половых хромосом: количественные или структурные

аномалии, гоносомный мозаицизм или несоответствие кариотипа фенотипическому полу – XX- и XY-инверсию пола [Курило и др., 2000; Сорокина, 2005].

Аномалии формирования пола и нарушение полового развития могут быть вызваны как численными мутациями половых хромосом (синдромы Клайнфельтера, Шерешевского-Тернера (СШТ), трисомия X, дисомия Y и др.), их структурными и микроструктурными перестройками (синдром 46,XX-мужчина, овотестикулярная форма НФП, XX- и XY-дисгенезия гонад, смешанная дисгенезия гонад, синдром тестикулярной дисгенезии), мутациями и делециями X- или Y-сцепленных генов (например, *SRY*, *DAX-1*, *SOX3*, *KAL1*, *AR*), гоносомным мозаицизмом, химеризмом 46,XX/46,XY [Прокофьева-Бельговская и др., 1969; Давиденкова и др., 1973; Голубева, 1980; Жуковский, 1989; Курило и др., 1994; 2000; Тарская, 1996; Бочков, 1997; Осипова, 1997; Осипова и др., 1997; Шаронин, 1998; Дергачева, 2002; Вяткина, 2003; Вяткина и др., 2003; Ворсанова и др., 2006; Курило, 2007; Moalem et al., 2012].

Помимо синдромов, связанных с анеусомиями половых хромосом, одними из наиболее частых мутаций у пациентов с нарушением репродукции являются структурные перестройки хромосом X и Y (Ширшова, 1992; Ворсанова и др., 1998а; 1998б; Савельева, 2002; Курило, Гришина, 2006). Так, цитогенетически идентифицируемые перестройки Y-хромосомы, и особенно микроделеции ее длинного плеча (локус Yq11.2 - AZF, 'azoospermia factor'), являются одной из наиболее частых причин нарушения сперматогенеза и бесплодия у мужчин, связанного с секреторной азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени [Tiepolo, Zuffardi, 1976; Reijo et al., 1995; Vogt et al., 1996; Simoni et al., 1999; Гоголевский, Гоголевская, 1999; Логинова и др., 2000; Черных, 2002]. Структурные перестройки X-хромосомы и гоносомный мозаицизм и могут быть причиной не только СШТ, но и XX-дисгенезии гонад, синдрома преждевременной недостаточности яичников, нарушения оогенеза и женского бесплодия [Cheng et al., 2009; Quilter et al., 2010]. Однако, механизмы образования, генетические и фенотипические эффекты многих аномалий гоносом изучены недостаточно.

Особую актуальность представляет широкое распространение активно развивающихся методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Использование экстракорпорального оплодотворения позволяет преодолеть многие

нарушения репродукции у женщин и мужчин, в том числе таких тяжелых формах мужского бесплодия [Foresta et al., 2001b; Johnson, 1998]. Однако следует учитывать повышенный риск передачи по наследству возможных генетических нарушений потомству, в первую очередь нарушений репродуктивной функции и необходимость медико-генетического обследования [Курило, 1997; Лебедев, 2007].

Изучение генетических причин и факторов нарушений репродукции позволяет улучшить диагностическую, лечебную и консультативную помощь пациентам с аномалиями формирования пола и полового развития, с бесплодием и невынашиванием беременности, совершенствовать медико-генетическое обследование и консультирование и мероприятия, направленные на профилактику нарушений репродукции.

Цель исследования.

Целью настоящей работы являлось установление роли аномалий половых хромосом в возникновение нарушений формирования пола, развития и функции репродуктивной системы у человека, а также создание алгоритмов их генетической диагностики.

Задачи исследования

1. Оценить частоту и спектр цитогенетически идентифицируемых хромосомных мутаций у пациентов с нарушением формирования пола и/или репродуктивной функции.

2. Провести молекулярно-генетический анализ генов и молекулярных маркеров хромосом X и Y у пациентов с различными мутациями половых хромосом, гоносомными синдромами, аномалиями формирования пола, с мужским бесплодием.

3. Оценить частоту и спектр цитогенетически идентифицируемых мутаций и микроделений Y-хромосомы у мужчин с нарушением репродуктивной функции.

4. Уточнить механизмы образования количественных и структурных мутаций половых хромосом с помощью использования комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического обследования.

5. Провести анализ гено-фенотипических корреляций у пациентов с различными аномалиями половых хромосом.

6. Разработать алгоритмы цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики у пациентов с различными формами нарушения формирования пола, вызванными мутациями половых хромосом.

Научная новизна и теоретическая значимость.

Впервые на выборке подобного масштаба (~15 тыс. обследованных) у пациентов с нарушением развития и функции репродуктивной системы определена частота и типы цитогенетических и микроструктурных мутаций половых хромосом. Оценен вклад различных мутаций в этиологию нарушений репродукции.

Впервые в мире в одной работе проведено комплексное исследование множества гоносомнообусловленных нарушений формирования пола/нарушений дифференцировки пола и развития гонад, показана и охарактеризована их генетическая гетерогенность, фенотипическая вариабельность (клинический полиморфизм), частичная перекрываемость многих гоносомнообусловленных форм за счет гоносомного мозаицизма и наличия микроструктурных перестроек с вовлечением локусов, вовлеченных в дифференцировку и развитие половой системы. Впервые выполнена систематизация гоносомнообусловленных форм нарушения формирования пола и созданы континуумы генитальных фенотипов при мозаицизме по половым хромосомам или фрагменту Yp+/SRY+, при химеризме XX/XY для различных гоносомнообусловленных синдромов (Шерешевского-Тернера, Клайнфельтера, 46,XX-мужчина и др.).

Впервые на материале множества структурных перестроек хромосом X и Y человека показано, что локализация точек разрыва при цитогенетически идентифицируемых и микроструктурных перестройках гоносом в значительной мере обусловлены их микроструктурой, сформированной в результате эволюции и определяющей расположение “горячих” точек рекомбинации (псевдоаутосомные и X-Y гомологичные регионы) и локализацию точек разрыва при ее макро- и микроструктурных перестройках (Xp22.3, Xq21.2, Yp11.2 и Yq11.2), возникающих в мейозе. Преимущественное расположение точек разрыва в гомологичных областях указывает на общность различных несбалансированных структурных перестроек таких, как транслокаций и терминальные делеции, что позволяет их расценивать как альтернативные продукты аномальной рекомбинацией между гомологичными областями. Локализация точек разрыва в на границах палиндромов и

инвертированных повторов Y-хромосомы указывает на наличие общего механизма возникновения дицентрических Yp хромосом и терминальных Yq11.2 делеций, а также Y-инверсий.

Впервые в мире у пациентов с Xp;Yp Xq;Yr транслокациями (SRY+XX-инверсией пола) обнаружена вторая по частоте встречаемости «горячая область» X-Y рекомбинации в коротком плече хромосомы Y – ген *PCDH11Y*.

Впервые в мире проведен детальный анализ (включая различные полные и неполные типы) микроделеций Y-хромосомы (локус AZF, Yq11.2) у российских мужчин с нарушением репродуктивной функции. Показано, что преобладающими типами микроделеций Y-хромосомы являются делеции региона AZFc, среди них наиболее делеции: b2/b3, b2/b4 и g/gr.

Впервые в мире показана высокая частота микроделеций локуса AZF у пациентов, имеющих не только мозаицизм X/XY, но и при мозаичной ди-/полисомии Y, что, очевидно обусловлено митотической нестабильностью перестроенной хромосомы Y. В отличие от терминальных (цитогенетически идентифицируемых) Yq делеций и крупных полных AZF-делеций, например, AZFb+c и AZFc (b2/b4), частичные микроделеции региона AZFc и инверсии не приводят к митотической нестабильности Y-хромосомы и X/XY-мозаицизму.

Впервые в мире у пациентов с XX-инверсией пола (синдрома 46,XX-мужчина и его цитогенетические варианты) обнаружен необычный тип скрытого гоносомного мозаицизма по SRY+ хромосоме X, который может являться причиной фенотипической вариабельности у пациентов с SRY+ XX-тестикулярным и SRY+ XX-овотестикулярным нарушением формирования пола.

Практическая значимость.

Результаты исследования, положения, выводы и предложения, содержащиеся в работе, являются концептуальной основой для совершенствования медико-генетического обследования и консультирования пациентов с нарушением формирования пола и репродуктивной функции. В работе приведены алгоритмы (протоколы) цитогенетического и молекулярно-генетического обследования при гоносомно-обусловленных нарушениях формирования пола, и показания для молекулярно-цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования при аномалиях половых хромосом. Разработанные системы молекулярного анализа

последовательностей Y-хромосомы могут быть использованы для определения генетического пола, верификации природы маркерных (X и Y) хромосом, гоносомного мозаицизма, несбалансированных структурных перестроек половых хромосом (делеций и транслокаций гена *SRY*, делеций в локусе *AZF*) и уточнения/картирования их точек разрыва.

Основные результаты работы включены в лекционный материал для врачей-генетиков, эндокринологов, андрологов, акушеров-гинекологов и специалистов в области ЭКО и могут быть использованы для создания учебных пособий для ВУЗов для обучения студентов-медиков и биологов, повышения квалификации врачей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что частота гоносомных, аутосомных и аутосомно-гоносомных мутаций (согласно данным цитогенетического обследования) у пациентов с нарушением развития/функции репродуктивной системы составляет 4,39%, 0,66%, 0,12%, соответственно. На числовые и структурные аномалии гоносом приходится 87,2% хромосомных мутаций. Среди аномалий гоносом превалирует анеуплоидия по хромосоме X (55,8% мутаций половых хромосом). У 26,4% пациентов с аномалиями гоносом присутствует хромосомный мозаицизм.

2. Установлено, что аномальная рекомбинация между гомологичными областями хромосом X и Y является основным механизмом транслокаций, делеций половых хромосом, а Y-Y рекомбинация – основным механизмом микроструктурных перестроек Y-хромосомы, а также дицентрических хромосом Y.

3. Выявлена существенная гетерогенность гоносомнообусловленных нарушений формирования пола, которая в значительной мере обусловлена количеством (дозой генов) хромосомы X в кариотипе, а также наличием/отсутствием гоносомного мозаицизма или его вариантом, сохранностью гена *SRY* и количественной представленностью *SRY+/Y+* клеточного клон(ов).

4. Выявлен выраженный фенотипический полиморфизм формирования пола и различная степень нарушения развития и функции репродуктивной системы при мозаицизме по Y-хромосоме и химеризме 46,XX/46,XY (от женского, двойственного до мужского развития развития половой системы). В отличие от мозаицизма X/XY при мозаицизме/химеризме XX/XY степень развития по

мужскому полу прямо зависит от количества Y-позитивных клеток в лимфоцитах периферической крови.

5. Установлено, что терминальные и интрестициальные делеции, дицентрические и кольцевые хромосомы хромосомы Y характерны для мозаицизма по хромосоме Y с наличием анеуплоидного клона(ов), например, X/X_Y и его вариантов, и не характерны для мозаицизма/химеризма 46,XX/46,X_Y. Выявлена повышенная частота встречаемости микроделеций Y-хромосомы у мужчин с бесплодием, имеющим сбалансированные перестройки аутосом и гетероморфизмами/вариантами гетерохроматина длинного плеча Y-хромосомы.

6. Выявлена высокая частота ошибок (до 40%) генетической диагностики мутаций гоносом при использовании только цитогенетического исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

В соответствии с формулой специальности «03.02.07 – Генетика (медицинские науки)», охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях в области «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Генотоксикология. Генотерапия», настоящая работа посвящена изучению аномалий половых хромосом и их роли в нарушении формировании пола, развития половой системы и репродуктивной функции у человека. Особое место в работе уделено исследованию цитогенетически идентифицируемых количественных, макро- и микроструктурных аномалий половых хромосом с вовлечением Y-хромосомы или ее материала, а также гоносомного мозаицизма.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на: V, VI и VII Съезде Российского общества медицинских генетиков (2005, 2010, 2010), Конференциях европейского общества цитогенетиков (2005, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015), Американской цитогенетической конференции (2012), Конференциях европейского общества генетиков человека, ESHG (2004-2015), X-ой научной Конференции с международным участием «Генетика человека и патология: проблемы

эволюционной медицины» (Томск, 2011, 2014), международном симпозиуме «Генетика мужского бесплодия» (Флоренция, 2013), европейской рабочей группе по яичкам (2010) и американской группе по яичкам (2011), 7-ом Европейском конгрессе андрологов (2012), Конференции американского общества андрологов (2011), 9-ом Международном Конгрессе андрологов (2009), V-ой Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 25-летию лаборатории Пренатальной диагностики ФГБУ «НИИ АГ им. Д.О. Отта» (Санкт-Петербург, 2012), V-ом Международном Конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2011), Российском научно-образовательном Форуме «Мужское здоровье и долголетие» (Москва, 2005-2015) на межлабораторном семинаре и семинаре студенческого научного кружка в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр», Москва.

Личный вклад автора в проведение исследования

Автор лично на всех этапах работы участвовал в исследовании, им выполнены: разработка идеи, определение цели и задач, выбор методов и материала исследования, организация и проведение всех этапов работы. Автором лично проведено обследование 14856 больных с нарушением формирования пола и репродуктивной функции, из которых выделены 1279 пациент с мутациями половых хромосом и гоносомнообусловленными аномалиями формирования пола. Осмотр пациентов и членов их семей, верификации диагнозов, сбор материала для проведения цитогенетической и молекулярно-цитогенетической ДНК-диагностики выполнены автором самостоятельно. Автор лично участвовал в разработке методов молекулярно-генетической диагностики мутаций половых хромосом, в выполнении цитогенетического и молекулярно-генетического исследования пациентов и членов их семей определил. Автором проанализирована современная отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, проведен статистический анализ данных, сформулированы результаты и выводы.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 82 научных работы, из них 33 - в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ, а также 2 учебных пособия и 1 коллективной монографии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфогенетические и генетические аспекты дифференцировки пола и развития половой системы у человека.

1.1.1. Морфогенез и развитие мочеполовой системы у человека.

Развитие половой (репродуктивной) системы у человека представляет собой многостадийный биологический процесс, который проходит в пре- и постнатальный периоды онтогенеза и определяется взаимодействием большого количества факторов. По отношению к действию эндокринных факторов в процессе развития женской и мужской половой системы можно выделить два этапа: первый – гормонально-независимый и второй – гормонально-зависимый. В ходе первого (2-7-ая неделя внутриутробного развития) происходит закладка бипотенциальных гонад, парных Вольфовых и Мюллеровых протоков и других структур, из которых формируются внутренние и наружные половые органы, а также ранние процессы гаметогенеза – образование первичных половых клеток (ППК), их пролиферация, миграция и заселения дифференцирующихся гонад, собственно дифференцировка гонад. В ходе второго (с 8-ой недели внутриутробного развития), заканчивающегося в постнатальный период после полового созревания под воздействием половых гормонов происходит развитие наружных и внутренних половых органов.

Поскольку ранние этапы развития половой системы и мочевыделительной системы в значительной мере связаны, их морфогенез будет описан ниже совместно.

Зачаток канальцев предпочки (пронефроса) формируется у 3-недельного эмбриона человека в области нефрогенного тяжа – производного промежуточной мезодермы. Зачаток первичной почки (мезонефроса) формируется из области нефротомы в период 3-4 недель эмбрионального развития, каудальнее канальцев пронефроса, дегенерирующих по мере развития мезонефроса. С этого периода пронефрические протоки соединяются с канальцами мезонефроса и называются мезонефральными (Вольфовыми) протоками (рис. 1). Вторичная (окончательная, дефинитивная) почка (метанефрос) является производным клеток заднего отдела Вольфова протока и нефрогенной ткани заднего конца мезонефроса, и формируется у эмбриона человека на 6-8 неделе развития. Парамезонефральные

(Мюллеровы) протоки образуются из участка промежуточной мезодермы. На дистальном конце каждого из пары Вольфовых протоков в зоне их вхождения в клоаку формируются выросты – закладки мочеточников. Они прорастают каудальнее в промежуточную мезодерму и формируются каналцы метанефроса. До половой дифференцировки у эмбриона человека присутствуют 2 системы протоков: Мюллеровы и Вольфовы (рис. 1).

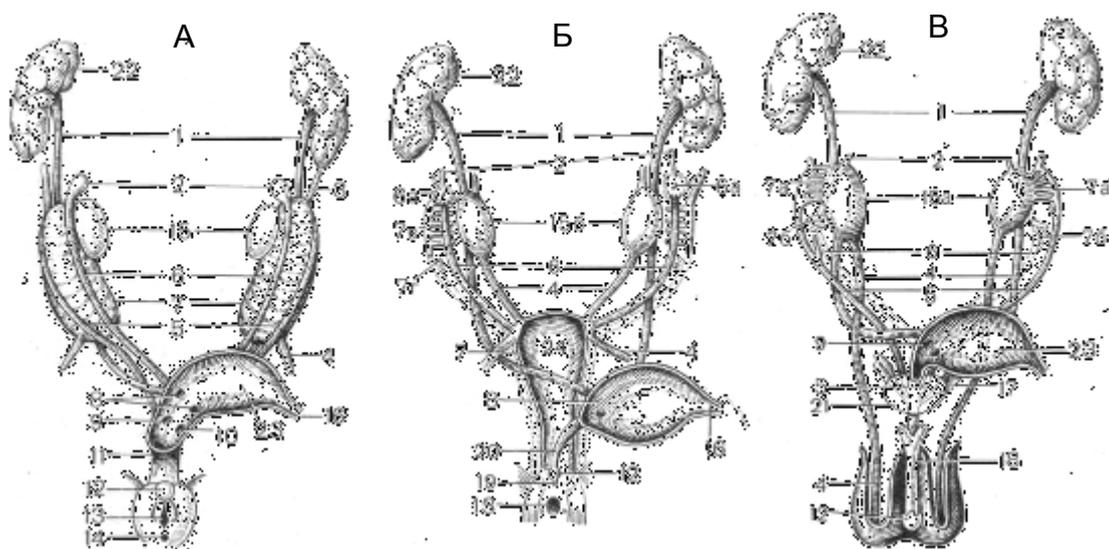


Рис. 1. Индифферентная закладка мочеполовой системы и ее дальнейшее развитие у зародышей женского и мужского пола (по Корнингу из А. А. Заварзина).

Примечание: А – индифферентная закладка; ее развитие по женскому (Б) и мужскому (В) типу. 1 – мочеточник; 2 – расширенный конец парамезонефрального (Мюллерова) протока (А) и стебельчатая гидатида (Б, В); 3, 4 – связки первичной почки (Вольфова тела) и половой железы; 5 – каналы первичных почек (Вольфовы протоки); 6 – парамезонефральные протоки; 6а – воронки яйцеводов; 7 – первичные почки (Вольфовы тела); 7а – придаток яичка; 7б – придаток привеска яичка (парадидимис); 7в - придаток яичника эпоофорон: 7г - параоофорон; 8 - отверстие мочеточника; 9 - отверстия парамезонефральных протоков (А); мужская (простатическая) маточка (В); 10 - отверстия каналов первичных почек (отверстия Вольфовых протоков); 11 – мочеполовой синус; 12 – половой бугорок; головка полового члена; 13 – половая щель (А); преддверие влагалища (Б); 14 – анус; 15 – гонада (индифферентная закладка); 15а – семенник; 15б – яичник; 16 – урахус (дистальная часть аллантоиса); 17 – семенной пузырек; 18 – пещеристые тела; 19 – отверстие женского мочеиспускательного канала; 20 – мочеиспускательный канал; 21 – предстательная железа; 22 – вторичная почка; 23 – мочевого пузыря; 24 – матка.

Область закладки гонад (половые валики) у человека развиваются как пол-индифферентные образования на вентральной стороне мезонефроса из мезотелия (рис. 1, 2). Первичные (примордиальные) половые клетки, ППК или гоноциты обособляются из эпибласта на стадии гаструлы. Их выявляют у эмбриона 14-15 дней развития. Из области кишечной эктодермы через энтодерму желточного мешка ППК мигрируют в область будущих зачатков гонад (4-6-ая неделя внутриутробного развития), при этом многократно митотически делятся (рис. 2).

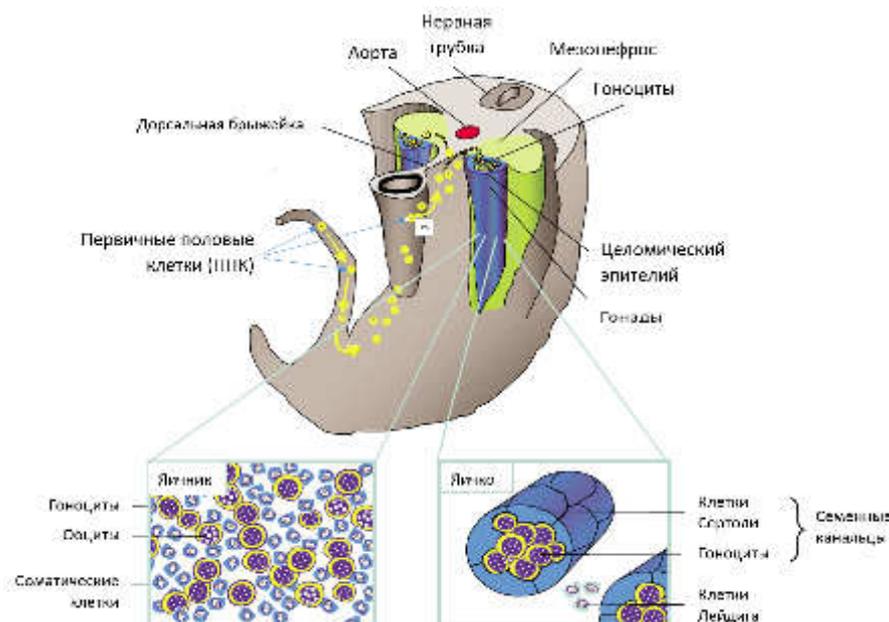


Рис. 2. Миграция первичных половых клеток (ППК) в область закладки гонад – половые валики (показаны голубым цветом) и начало их половой дифференцировки.

Гоноциты, локализованные в гонадах, также митотически делятся, формируя пул незрелых половых клеток. Хронология и динамика дальнейшей их дифференцировки зависят от пола эмбриона. Постмигранторные гоноциты в семенных канальцах переходят в просперматогонии. В период колонизации бипотенциальных гонад в средней их части формируется утолщение из пролиферирующих эпителиальных клеток целома, которую пенетрируют иммигрирующие ППК. Индифферентные гонады состоят из клеток различного происхождения, при этом гоноциты вступают во взаимодействие с соматическими клетками, являющимися предшественниками различных типов: клетки Сертоли/клетки гранулезы, клетки Лейдига/тека-клетки и другие аналоги (рис. 3).

Принципиально важным в дифференцировке соматических клеток гонад по женскому типу и формированию яичника является их взаимодействие с постмигранторными гоноцитами. Только при наличии ППК формируются фолликулы, в противном случае происходит дисгенезия яичников/гонад с наличием только стромальных элементов. В отличие от дифференцировки соматических клеток овариальной ткани, наличие/отсутствие ППК в гонадах не является необходимым условием для дифференцировки тестикулярной ткани и формирования яичка, однако их отсутствие в формирующихся яичках приводит к развитию синдрома «только клетки Сертоли», и, как следствие, к секреторной азооспермии и мужскому бесплодию.

У человека гонады становятся различимы по полу у 6-недельного эмбриона. У эмбриона мужского пола развиваются яички, в которых формируются семенные каналы, выстланные клетками Сертоли и примембранно расположенными просперматогониями (рис. 3).

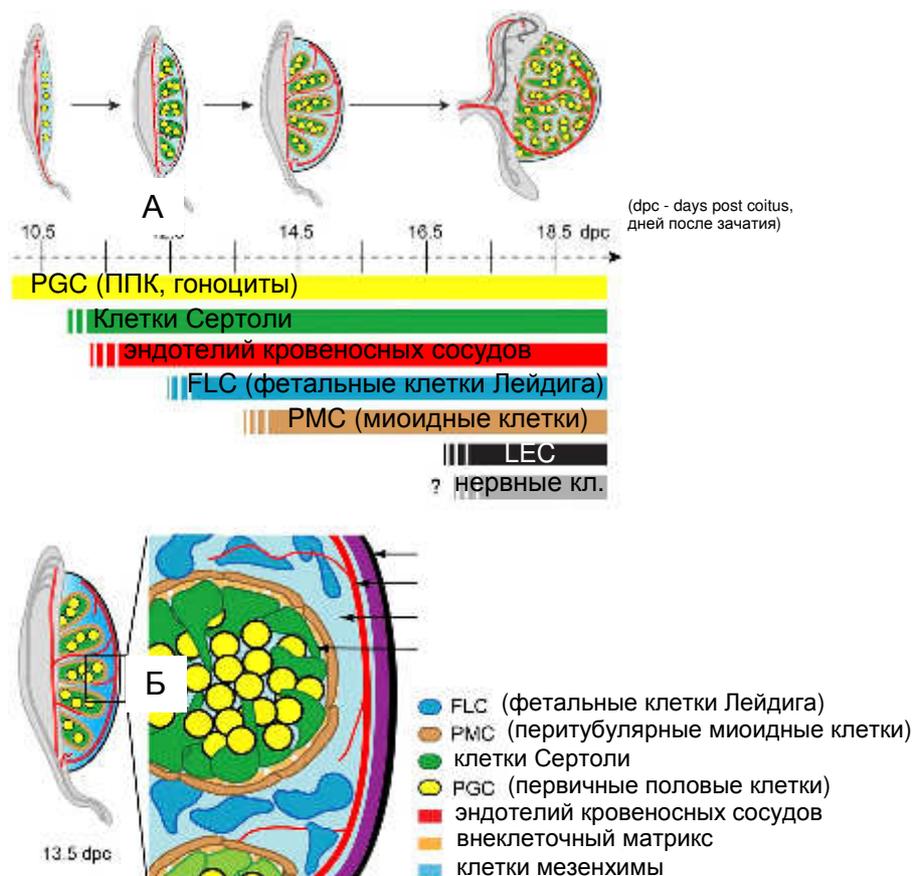


Рис. 3. Морфогенез семенников (тестикул) у мышей [Svingen, Koorman, 2013].

(А) Изменение строения гонад, дифференцирующихся по мужскому типу. Первичные половые клетки, PGC (показаны желтыми кружками) колонизируют половые валики до начала дифференцировки. Первыми клетками гонад,

дифференцирующимися по мужскому типу являются клетки Сертоли (показаны зелеными) и мигрирующие в развивающееся яичко эндотелиальные клетки, формирующие кровеносные сосуды (показаны красным цветом). После образования клеток Сертоли происходит дифференцировка фетальных клеток Лейдига, FLC (показаны голубым цветом) и перитубулярных миоидных клеток, PMC (показаны коричневым цветом). Сосудистая сеть становится более сложной, развитие венозной сети и лимфатических эндотелиальных клеток, LEC (показаны черным цветом). (Б) Семенник самца мыши (13.5 дрс) содержит тяжи, разделенные интестицием, большинство типов клеток присутствует, располагаясь на своем месте. Семенные каналцы содержат незрелые половые клетки, в которых заблокировано митотическое деление, окруженные клетками Сертоли, снаружи от них перитубулярные миоидные клетки (PMC) и внеклеточный матрикс, оказывающие структурную поддержку. Интерстициум представлен FLC, клетками мезенхимы и сосудов. Начинает формироваться белочная оболочка яичка (*tunica albuginea*).

К моменту полового созревания семенные каналцы заполняются герминативным эпителием, во время которого в них формируется люминальная зона и с этого момента они называются извитые семенные каналцы, ИСК. Клетки сперматогенного эпителия начинают митотически делиться, но вступают мейоз только с наступлением пубертата. Если дифференцировка гонад по мужскому типу не происходит или запаздывает гоноциты входят в мейотического деление, а поддерживающие клетки дифференцируются в клетки гранулезы, а гормон-продуцирующие – в тека-клетки, формируются фолликулы, происходит разделение коркового и мозгового слоя, что приводит к развитию яичников.

Клетки Сертоли занимают ведущую роль в развитии тестикул, являясь связующим “центром” дифференцировки и развития по мужскому типу. Они первыми входят в процесс дифференцировки, обеспечивая формирование семенных каналцев, регрессию Мюллеровых протков, стимулируют дифференцировку других типов клеток тестикул: фетальных клеток Лейдига, перитубулярных миоидных и эндотелиальных клеток, контролируют образование и деление незрелых мужских половых клеток (рис. 3, 4).

У 8-недельного плода мужского пола из клеток мезенхимы дифференцируются клетки Лейдига, продуцирующие тестостерон под влиянием хорионического гонадотропина, ХГ (рис. 4). Выводящие пути мужской половой системы развиваются из Вольфовых протоков, которые у 8-недельных эмбрионов

начинают соединяться с протоками яичек, образуя придаток яичка (эпидидимис). Средняя часть Вольфовых протоков, удлиняясь, преобразуется в семявыносящие протоки, а из их нижней части формируются семенные пузырьки. Под влиянием андрогенов развиваются простата и Куперовы (бульбоуретральные) железы из эпителия мочеиспускательного канала, мышечные и соединительно-тканые элементы простаты – из мезенхимы. Просветы простаты формируются в пубертатном периоде.



Рис. 4. Этапы внутриутробного развития половой системы у плода мужского пола (ориг.). Снизу указана шкала срока гестации в неделях пренатального развития.

У 11-18-недельных плодов мужского пола уровень тестостерона достигает такого в крови половозрелого мужчины. Столь высокая концентрация тестостерона обеспечивает морфогенез внутренних мужских половых органов: развитие внутренних мужских половых протоков – придатка яичка (эпидидимиса), семявыносящих протоков (*vas deferens*) и семенных пузырьков (из Вольфовых протоков и канальцев верхнего участка мезонефроса), а под воздействием дигидротестостерона формируются наружные половые органы – половой член, мошонка и предстательная железа.

Зачатки внутренних женских половых органов – матки, маточных труб, верхней части влагалища образуются с 4-5-й недели внутриутробного развития из

Мюллеровых протоков. Канализация влагалища, формирование полости матки и морфогенез шейки и тела матки происходят у 4-5-месячного плода человека.

Зачатки наружных половых органов начинают обособляться на 5-й неделе эмбриогенеза. Половые валики (определяемые к концу 4-й недели) происходят из окружающей половой бугорок мезенхимы, разрастание которой формирует зачаток клитора или головку полового члена и половые складки, преобразующиеся либо в половые губы, либо в мошонку. Между половым бугорком и половыми складками открывается первичное половое отверстие. У эмбриона женского пола половые валики и половые складки не срастаются (как у эмбриона мужского пола) и формируются большие и малые половые губы (рис. 5).

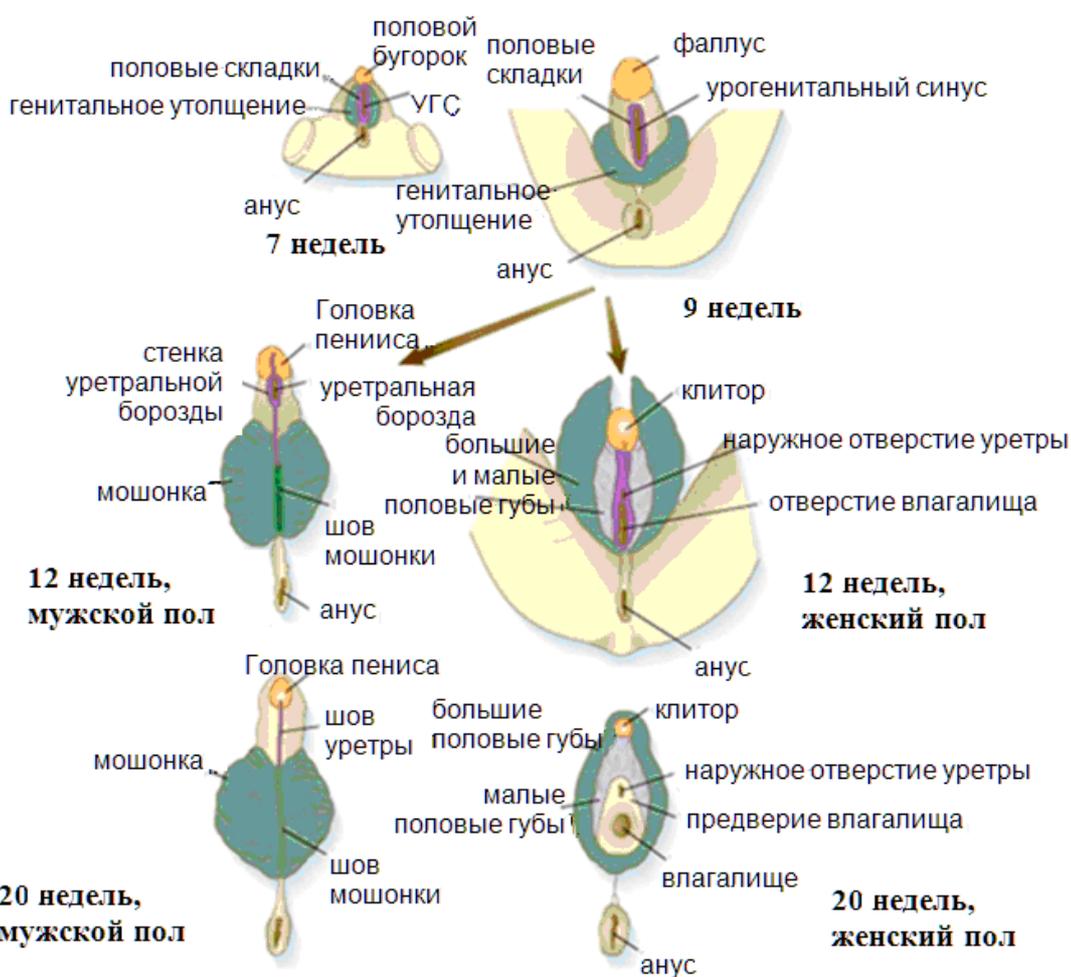


Рис. 5. Формирование наружных гениталий у плодов женского и мужского пола. Внешний вид половых органов на индифферентной стадии (7-9-ая неделя гестации) и при их развитии по мужскому или по женскому типу у плода 12 недель и поздних сроках беременности [из Human Embryology and Development Biology, 2009].

Дифференцировка наружных мужских половых органов начинается на 8-12-ой неделях внутриутробного развития и завершается к 5-му месяцу внутриутробного развития. Половой член формируется из полового бугорка; половые валики срастаются и формируют кожную часть мошонки. В последнюю через паховый канал врастают выпячивания брюшины – карманы, в которые смещаются яички. Их опускание зависит от действия андрогенов и ХГ и осуществляется вследствие смещения анатомических структур. Рост уровня андрогенов стимулирует удлинение генитального бугорка, приводя к формированию фаллуса и срединного слияния тканей и мошонки. Если по каким-то причинам развитие по мужскому типу нарушается после дифференцировки тестикул (дефицит продукции андрогенов или сниженная чувствительность к ним) возникает недостаточность маскулинизации – «синдром неполной маскулинизации», а избыточная продукция андрогенов у плодов женского пола – вирилизация или частичная маскулинизация (рис. 6).



Рис. 6. Нормальное и anomальное развитие уrogenитального синуса и наружных половых органов. Схематичное представление об анатомии нормальных женских (крайние слева) и нормальных мужских (крайние справа), а также ряд изображений, демонстрирующих различную степень вирилизации у женщин согласно степеням I-V по Прадеру. Наличие матки (показано сиреневым цветом) у вирилизированных пациентов женского пола с полностью маскулиненным внешним видом наружных половых органов – стадия V по Прадеру [Prader A., 1954].

До и в момент дифференцировки гонады находятся рядом с почками, прикреплены дорсальной и вентральной связками, из последней формируется gubernaculum. У плодов женского пола (в отсутствие андрогенов) дорсальная связка сохраняет положение яичника близко к почке, тогда как вентральная связка

и Вольфовы протоки подвергаются инволюции. У мужчин под влиянием андрогенов происходит регрессия дорсальной связки, а под действием АМГ – регрессия Мюллеровых протоков. Губернакулум растет и утолщается, в результате яички начинают смещаться в паховую область. К концу 12-й недели гестации они смещаются в область таза, к месту будущих паховых каналов. Процесс опускания яичка подразделяют на 2 этапа. В ходе первого (внутрибрюшного) происходит миграция яичка в область пахового канала. Наиболее важным из факторов, контролирующим этот процесс, является INSL3 (инсулиноподобный фактор 3) или релаксин-подобный фактор (RLF), продуцируемый клетками Лейдига [Ivell, Bathgate, 2002]. Впоследствии формируются паховый канал и мошонка, в которые опускаются яички вскоре перед рождением – второй этап [Hutson et al., 1997]. В его реализацию, по-видимому, вовлечен губернакулум, облегчающий процесс опускания яичка в мошонку. На 7-8-м месяце яички, пройдя через паховые каналы, достигают мошонки. Нарушение этого процесса может быть вызвано рядом факторов, в том числе – генетических, что приводит к одно- или двустороннему крипторхизму.

В период формирования половых протоков и наружных половых органов происходит дальнейшее становление гормональной функции яичек и ее регулирующих механизмов: дифференцировка ЦНС (в частности, гипоталамуса), секреция гонадотропинов. Андрогены, воздействуя на клетки-мишени головного мозга на 4-7-м месяцах беременности, приводят к потере циклической функции центра (функционирующего у женщин) и становлению тонического типа секреции гонадолиберина и гонадотропинов [Дедов и др., 2002].

С наступлением полового созревания, наступающей под влиянием активации фактора *KISS*, в гипоталамусе начинается секреция – гонадотропин-релизинг гормона (гонадолиберина), который воздействуя на гипофиз стимулирует выработку гонадотропных гормонов – лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ). Гонадотрипины, поступая в кровоток, достигают клетки-мишени гонад, воздействуя на них, приводят к повышению секреции половых гормонов и стимулируют созревание половых клеток. Дефекты гонадолиберина или его рецептора вызывают задержку полового созревания, гипогонадотропный гипогонадизм, а гиперактивация преждевременное половое

развитие, характеризующееся высоким уровнем гонадотропинов [Дедов и др., 2002]. Дефекты функции рецепторов к гонадотропинам являются причиной нарушения развития половой системы и/или гаметогенеза, мужского и женского бесплодия. Первичное нарушение формирования, развитие гонад, тяжелые формы нарушения гаметогенеза, приводят к первичному, гипергонадотропному гипогонадизму.

Воздействие половых гормонов на головной мозг стимулирует половую дифференцировку его структур, постнатально контролирующую половую аутоидентификацию и половое поведение. Установлено, что ген *SRY* (кольцевая форма его продукта) экспрессируется не только в гонадах, но и в структурах головного мозга, что свидетельствует в пользу его вовлеченности в эти процессы. Однако факторы, в том числе кодируемые половыми хромосомами, как и механизмы их взаимодействия, регулирующие половую дифференцировку головного мозга, недостаточно изучены. Очевидно, что нарушения этого процесса могут приводить к аномалии формирования пола на данном уровне – к гендерной дисфории или *транссексуализму*, который характеризует инверсией половой аутоидентификации и полового поведения [Курило и др., 2013].

1.1.2. Генетическая детерминация и дифференцировка пола у человека.

У человека пол предопределяется (детерминируется) в момент оплодотворения, т.е. на стадии зиготы. Данный тип детерминации пола называется сингамным, пол определяется при слиянии гамет [Иванов и др., 2006]. Млекопитающие относятся к гетерогаметным организмам, генетический пол которых определяется набором половых хромосом. У человека имеется две половые хромосомы (гоносомы): X и Y, которые значительно различаются по размеру, строению и генному составу, подверженности к инактивации и другим признакам. Женский пол – гомогаметный – все яйцеклетки содержат в норме одну половую хромосому X (гаплоидный набор – 23,X), мужской – гетерогаметный, т.е. в норме образуется два типа сперматозоидов, одни из них несут X-хромосому, другие Y-хромосому (гаплоидные наборы – 23,X или 23,Y, соответственно). Соответственно в норме пол человека детерминируется (предопределяется) набором половых хромосом (XX или XY), что свою очередь

определяется, X-несущим или Y-несущим сперматозоидом оплодотворяется яйцеклетка. Аномалии оплодотворения и раннего эмбрионального развития приводят к возникновению химеризма, к андрогенезу или гиногенезу, триплоидии или анеуплоидии, однородительской дисомии.

Хотя набор половых хромосом в большинстве случаев определяет генетический пол, но всегда не тождественен ему и составляет хромосомный уровень пола [Черных, Курило, 2001a]. Это обусловлено тем, что гены, контролирующие дифференцировку пола и развитие органов половой системы, располагаются как на гоносомах, так и различных аутосомах. Их состояние (наличие или отсутствие мутаций), количество и экспрессия определяют генный уровень пола. Помимо хромосомных и генных мутаций генетическими причинами аномалий формирования пола могут быть эпигенетические нарушения. Эпигенетические факторы, необходимые для формирования пола и влияющие на развитие и функцию репродуктивной системы, составляют эпигенетический уровень. Таким образом, генетический пол состоит из 3 уровней: хромосомного, генного и эпигенетического.

1.1.3. Генетическая регуляция развития репродуктивной системы у человека.

Первые морфологические различия между плодами мужского и женского пола появляются только с 6-ой недели внутриутробного развития, когда происходит запуск процесса дифференцировки бипотенциальных гонад. До конца весь механизм, запускающий дифференцировку гонад по мужскому (яички) или женскому (яичники) типу, еще не определен. Он характеризуется сложным взаимодействием генов, определяющих направление развития половой системы. Ключевым событием в развитии тестикул дифференцировка клеток Сертоли, которая инициируется активацией гена *SRY* (*Sex-determining region on the Y*, прежнее название локуса TDF, *testis determining factor* – тестис-детерминирующий фактор) [Sinclair et al., 1990]. Хронология событий ранних этапов закладки, дифференцировки и развития гонад у мыши показана на рисунке 7. Экспрессия гена *Sry* в развивающихся тестикулах происходит в определенный временной интервал (10,5-12,5 dpc у мыши). Затем его активность снижается, что связано с метилированием его промотора, однако, точно механизм активации. Предполагают,

что инициация транскрипции гена *Sry* происходит под влиянием KTS+ изоформ белка гена *WT1* [Swain, Lovell-Badge, 1999]. В XY соматических клетках гонад являющихся предшественниками клеток Сертоли, экспрессия гена *Sry* начинается с 10,5 дня, достигая своего пика к 11,5 дню, и впоследствии снижается к 12,5 дрс. Несколькими часами позднее повышается экспрессия гена *Sox9*, приводя к дифференцировке клеток Сертоли. Экспрессия *Sox9* достигает своего максимума к 11,5-12,5 дню, и продолжает сохраняться постнатально, поддерживаясь несколькими положительно-регулирующими сигнальными системами, включая *FGF9*, простагландин D2, а также положительную ауторегуляцию), приводя к активации ряда специфичных для мужского пола генов, в том числе *Amh*. К 12,5 дню тяжи семенников сформированы, и видны морфологические отличия тестикул и яичников (рис. 7).

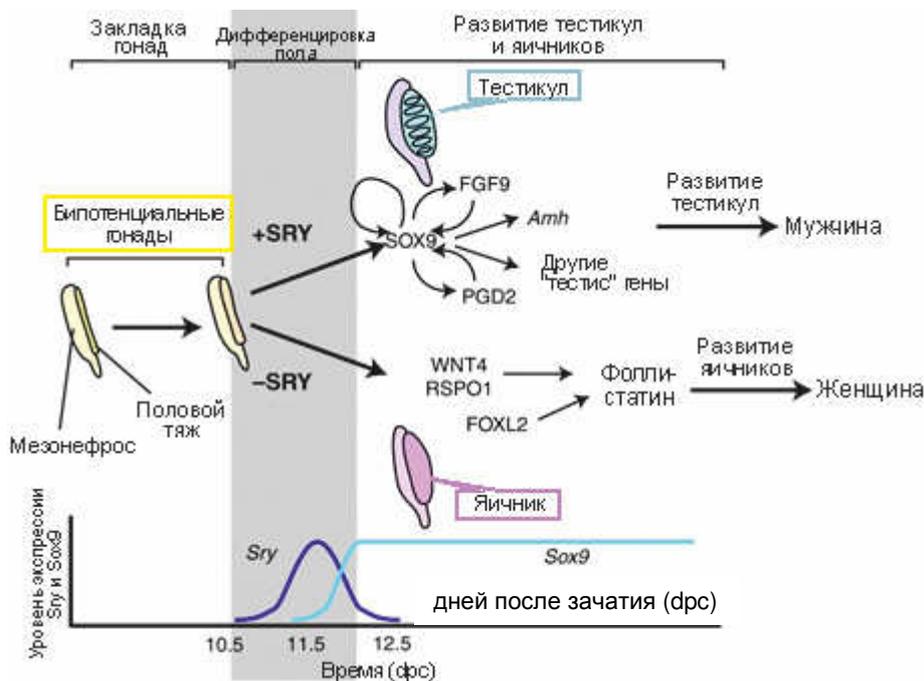


Рис. 7. Общая схема половой дифференцировки у мыши.

В отсутствие активности *Sry*, такие гены как *Wnt4*, *Rspo1* и *Foxl2* экспрессируются согласно женскому полу, что индуцирует дифференцировку гонад и развитие яичников, характеризующихся экспрессией фоллистатина и других оварио-специфичных генов. Помимо гена *SRY* процесс дифференцировки клеток Сертоли регулируется и рядом других генов, среди них его гомологами: *SOX3* и *SOX9* (рис. 8). В случае отсутствия гена *SRY*, либо наличия в нем мутации, при низкоуровневом мозаицизме по хромосоме Y, а также при отсутствии

гиперактивности генов, вовлеченных в дифференцировку тестикул, не происходит развития яичек. При этом пороговое значение количества (%) клеток, несущих хромосому Y или ее фрагмент Yp, экспрессирующих ген SRY в дифференцирующихся гонадах составляет 20-25% [Burgoyne, 1991]. При меньшем значении развития тестикулярной ткани либо не происходит, либо возникает дисгенезия гонад или развитие овотестикулярной гонады, содержащей как элементы тестикулярной, так и овариальной ткани.

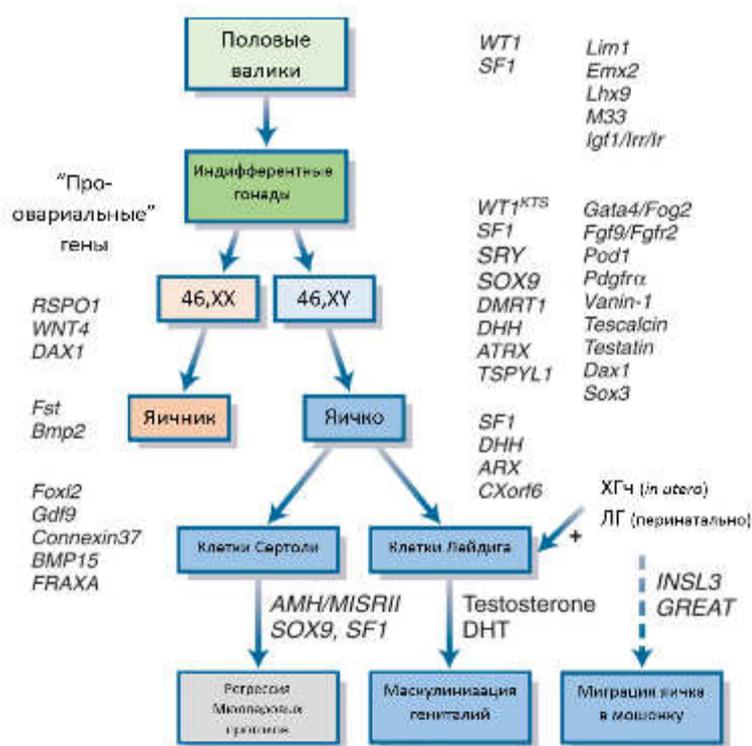


Рис. 8. Каскад дифференцировки гонад и формирования пола у млекопитающих и гены, вовлеченные в их генетический контроль.

До момента заселения гонад первичные половые клетки у млекопитающих и человека не дифференцированы, но предетерминированы по полу. Их дифференцировка на мужские и женские происходит только после заселения гонад под воздействием сигналов, получаемых от дифференцирующихся соматических клеток, составляющих гонады. Детально генетический механизм этих процессов у человека и других млекопитающих не определен, однако установлено, что при дифференцировке гоноцитов значимую роль играют гены *Wnt4* и *Wnt5a*. *Wnt4/5a* сигнальный путь координирует процессы клеточной адгезии входа гоноцитов в мейоз в ходе развития фолликулярной ткани развивающихся яичников [Naillat et

al., 2010]. Активность гена *Wnt4* связана с сохранением в развивающихся фолликулах характерной для женского пола экспрессии генов, в частности E-кадгерина и β -катенина в ППК. *Wnt4* может контролировать вход гоноцитов в мейоз посредством регуляции активности генов *Stra8* и *Cyp26b1*. Фермент, кодируемый последним из них, участвует в деградации ретиноидной кислоты и ингибирует вход в мейоз ППК в развивающихся яичках, а активация *Stra8* индуцирует вход в мейоз ППК в развивающихся яичниках через ретиноидную кислоту.

В бипотенциальных гонадах присутствуют соматические клетки-предшественники, которые в зависимости от их дифференцировки развиваются в соответствующие мужские или женские аналоги. Выбор направления развития поддерживающих клеток (в мужские - клетки Сертоли или женские – клетки гранулезы) осуществляется антагонистическим взаимодействием протестикулярных и проовариальных генов, центральное место среди которых занимает пара *SOX9* и *FOXL2* (рис. 7, 8). Активация экспрессии гена *SOX9* в дифференцирующихся гонадах является маркером развития тестикулярной ткани, формирования семенных канальцев. У человека в нормально развивающихся гонадах, экспрессия гена *SOX9* обнаружена в предшественниках клеток Сертоли, в то время как экспрессия гена *FOXL2* отмечена в клетках гранулезы, и в стромальных клетках формирующегося яичника. Если оба данных гена активно экспрессируются в пределах одной гонады это ведет к развитию двойственно развитой гонады – овотестис [Hersmus et al., 2008]. Экспрессия генов *Sry* и *Sox9* в гонадах подавляет дифференцировку по женскому типу и других соматических клеток и постмигранторных ППК (гоноцитов). Клетки Сертоли стимулируют другие клеточные линии к дифференцировке, в частности, клетки Лейдига, которые, в противном случае дифференцируются в тека-клетки яичника, и гоноциты в сперматогонии (их деление блокируют факторы *Fgf9*, *Cripto* и *Nodal*, *Activin A*, *TGFb*, *PDGF*), которые в противном случае становятся оогониями и вступают в мейоз.

На примере гена *SRY* можно наглядно рассмотреть генетический контроль дифференцировки пола по мужскому типу на разных уровнях: хромосомном, геномном и эпигенетическом. Для развития тестикул ген *SRY* должен присутствовать,

по крайней мере, в 20% предшественниках клеток Сертоли (*хромосомный уровень*) и не содержать точковых мутаций, нарушающих его функцию (*генный уровень*). Важным аспектом инициации дифференцировки гонад по мужскому типу является момент активации гена *SRY* и период активности в дифференцирующихся тестикулах. Его экспрессия происходит в строго определенном временном интервале, а если она происходит позднее, то это приводит к неполной дифференцировке гонад по мужскому типу и формированию яичка или дисгенетичного тестикула >овотестис> дисгенетичной стрек-гонады, в зависимости от степени запаздывания или нарушения экспрессии и/или активности *SRY* (*эпигенетический уровень*). Экспрессия *Sry* должна достигнуть порогового уровня в пределах временного интервала гестации 14–19 сомитов, что соответствует сроку примерно 11,2–11,75 дрс у мышей; для того, чтобы активировать экспрессию гена *Sox9*, тогда происходит дифференцировка клеток Сертоли и формирование семенных тяжей вдоль всей длины тестикула. Транскрипция гена *Sry* инициируется в группе поддерживающих клеток в центральной области бипотенциальных гонад. Из центра область экспрессии распространяется к полюсам гонад. У мышей *Sry* экспрессируется вдоль всей длины гонады только короткий период времени, после которого происходит снижение уровня его транскрипции сначала в центре, затем по периферии гонады. У крупных млекопитающих, включая человека, экспрессия *Sry* сохраняется после дифференцировки гонад. Отсроченная на несколько часов инициация активности гена *SRY* приводит к тому, что волна его экспрессии охватывает не всю гонаду целиком, что приводит к тому, что экспрессия *Sox9* ограничена центральной областью дифференцирующейся гонады, что приводит к двойственной ее дифференцировке - овотестис, характеризующейся наличием тестикулярной ткани в центре и овариальной по краям. Поздняя активация экспрессии *Sry* (после 11,75 дрс у мышей) приводит к отсутствию экспрессии *Sox9* в гонадах - к полному нарушению дифференцировки клеток Сертоли и развитию клеток гранулезы, овариальной ткани.

Помимо генов *SRY*, *SOX9*, ряд ключевых генов необходимо для формирования тестикул, например гены *SF1*, *DAX-1*, *WT1*. Они начинают экспрессироваться еще до активации гена *SRY* и активны не только в гонадах, так гены *SF1*, *DAX-1*, экспрессируются еще и в надпочечниках, а *WT1* – в почках. Нарушение их

активности, например, вследствие генной мутации или структурной перестройки хромосом в месте их локализации, приводит к нарушению формированию пола и соответствующим экстрагенитальным фенотипическим проявлениям.

Ген *WT1* (*Wilms tumor gene 1*) одним из наиболее сложных белок-кодирующих генов. Благодаря альтернативному сплайсингу он может кодировать до 64 изоформ белка. Одна из его изоформ запускает транскрипцию гена *SRY* [Swain, Lovell-Badge, 1999]. Отсутствие гена *WT1* летально, так как вызывает тяжелое нарушение формирование мочеполовой системы с отсутствием почек и гонад. Нарушение активности гена *WT1* может быть обусловлено структурными перестройками короткого плеча хромосомы 11, например, делециями в локусе 11p13, приводящими к синдрому WAGR. Точковые мутации в зависимости от тяжести мутации приводят к развитию синдрома Денис-Дрэша и синдрома Фрезье, характеризующихся нарушением дифференцировки гонад и формирования клубочкового аппарата почек, развитием хронической почечной недостаточности.

Ранее предполагали, что главным «анти-тестис» геном является ген *DAX1* (*NROB1*), так как дубликации короткого плеча X-хромосомы, захватывающие локус Xp21, вызывают нарушения формирования тестикул, приводя к полной или частичной дисгенезии гонад и XY-инверсии пола. Поэтому было предложено назвать его *DSS* (*Dosage-sensitive sex reversal*) локусом [Swain, Lovell-Badge, 1999]. Однако впоследствии установлено, что экспрессия *DAX1* необходима для нормального формирования тестикул, а в формировании яичников главную роль играют другие гены.

Другим важным аутосомным геном в контроле дифференцировки и морфогенеза половой системы является *SF1* (*Ad4BP/NR5A1*). Он кодирует стероидогенный фактор *SF1* – орфанный рецептор, контролирующий стероидогенез в надпочечниках и гонадах. Активация его экспрессии в дифференцирующихся гонадах включает гены, вовлеченные в дифференцировку пола и развитие половых органов, в частности гены, кодирующие фременты, контролирующие биосинтез стероидных гормонов. Нарушение функции *SF1* вследствие мутаций приводит к различным патологическим состояниям (от тяжелых до мягких форм): дефектам дифференцировки и развития, как мужской, так и женской половой системы (дисгенезии гонад при кариотипе 46,XX и 46,XY),

дефициту маскулинизации, гипоспадии и крипторхизму (46,XY), синдрому преждевременной недостаточности яичников (46,XX) или только нарушению репродуктивной функции.

Дифференцировка яичников по сравнению с дифференцировкой тестикул, имеет более лабильный характер. В формирование половой системы по женскому типу вовлечены несколько ключевых генов, по-видимому, действующих относительно автономно. Ооциты формируются и в отсутствие в половых клетках экспрессии *Foxl2*, при наличии активности в них других генов, контролирующих развитие женских ПК, таких как *Fig-alpha*, *Nobox* и других. Отсутствие или нарушение экспрессии *Foxl2* или независимо экспрессирующего от него гена *Wnt4* (по видимому, активирующегося после гена *Rspo1*) в соматических клетках гонад может приводить к частичной дифференцировке гонад по мужскому типу и развитие тестикулярной ткани у (SRY-)46,XX-мышей, тогда как у двойных нокаутов по данным генам происходит формирование семенных канальцев с наличием сперматогониев. Это свидетельствует, что по крайней мере, два автономных пути, контролирующих дифференцировку гонад по женскому полу, требуется для формирования яичников. Отсутствие функции *Foxl2* одного или в сочетании с *Wnt4* или *Kit/c-Kit* в формирующихся яичниках у мышей, вызывает изменение в экспрессии генов, контролирующихся генами *Sry* и *Sox9* [Schlessinger et al., 2010]. Эти данные подтверждают предположение о дозозависимом эффекте *Foxl2* и его роли “анти-тестис” гена, являющегося прямым антагонистом гена *SOX9* при дифференцировке гонад. Частичная потеря функции транскрипционного фактора, кодируемого геном *FOXL2* приводит к нарушению фолликулогенеза и синдрому преждевременной недостаточности яичников (СПНЯ). Недостаточность *Wnt-4* приводит к тому, что только 20% оогониев входят в мейотическое деление, а дефицит *Wnt-4* и *Wnt-5a* (у двойных мутантов) вызывает полное их отсутствие, что свидетельствует о их важной роли в контроле вступления в мейоз оогониев. Кроме того, показано, что ген *WNT4* может стимулировать экспрессию одного из «анти-тестис» генов – *DAX1*. Таким образом, соматические клетки яичника координируют фолликулогенез через Wnt-сигнальный путь [Vainio et al., 1999].

Ген *WNT4* располагается на коротком плече хромосомы 1 (локус 1p36.23-p35.1) и принадлежит к семейству генов *WNT*, кодирующих белки, вовлеченные в

межклеточное взаимодействие в эмбриональном развитии. Белок WNT4 участвует в развитии Мюллеровых протоков в матку, фаллопиевы трубы, шейку матки и верхнюю часть влагалища, почек, некоторых эндокринных желез, а также развитие женских половых клеток и выработку андрогенов. Описано несколько мутаций в гене *WNT4* у женщин с аплазией Мюллеровых протоков и дисфункции яичников, с синдромом Рокитанского-Кюстнера [Philibert et al., 2008]. Пациентки имеют кариотип 46,XX, развитые по женскому типу наружные половые органы, молочные железы, нормальное оволосение, но первичную аменорею. Мутации гена *WNT4* также могут приводить к синдрому SERKAL, характеризующемуся XX-инверсией пола, аномалиями почек, надпочечников и легких [Mandel et al., 2008].

1.2. Гаметогенез у человека: сперматогенез и оогенез. Митоз и мейоз.

Ранние этапы гаметогенеза описаны ранее в разделе 2.1. До вхождения в мейотическое деление незрелые половые клетки делятся путем митоза. Одним из важных отличий оогенеза от сперматогенеза является раннее (во внутриутробном периоде) вхождение женских НПК в мейоз. Оогонии вступают в мейоз, становясь ооцитами I (12-25-ая неделя), которые продят до диплотены профазы I мейоза, когда наступает аррест [Курило, 1985; 2012]. На 16-29-ой неделе гестации происходит формирование примордиальных фолликулов. К моменту рождения в яичниках присутствуют от 300,000 до 2 млн. фолликулов, около 40 тыс. из них сохраняются к началу пубертата, и только около 300 – начинают созревать, начиная с наступления полового созревания (менархе) до менопаузы [Курило, 1985; 2012]. Мужские ПК вступают в мейотическое деление только с науступлением пубертата с запуском гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [Райцина, 1982; 1983; 1985]. Центральную роль в регуляции полового созревания и гаметогенеза занимают гонадотропные гормоны, при этом для оогенеза ведущим является фолликулостимулирующий гормон, ФСГ, а для сперматогенеза – лютеинизирующий гормон, ЛГ [Райцина, 1983].

В отличие от соматических незрелые половые клетки (сперматоциты и ооциты) уникальны в том, что могут делиться как путем митоза, так и мейоза. В результате мейоза из диплоидных (2n) НПК образуются гаплоидные (n) гаметы – зрелые половые клетки: сперматозоиды и яйцеклетки. Мейоз включает из двух последовательных делений: мейоз I и мейоз II (рис. 9).

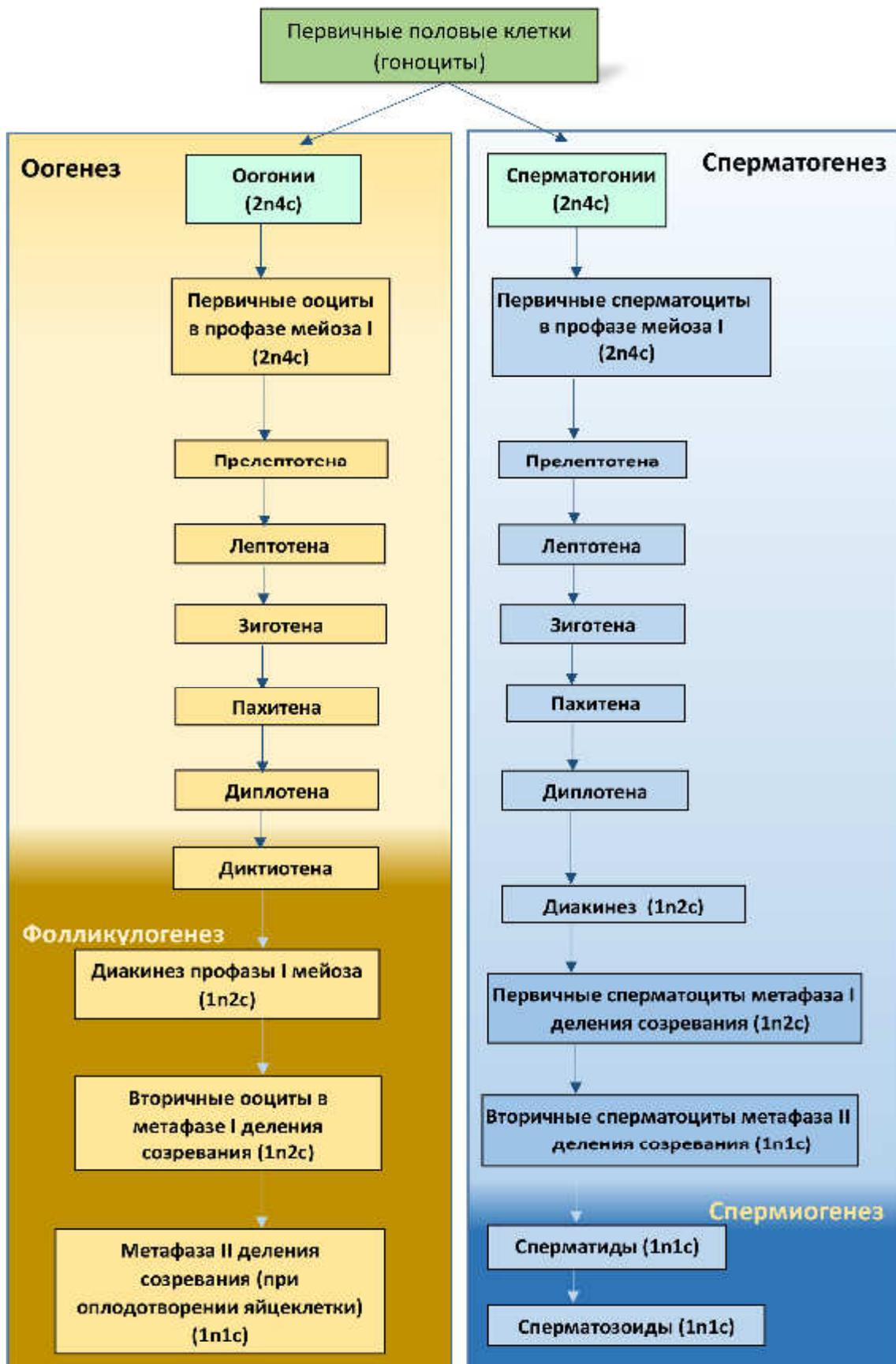


Рис. 9. Схема сперматогенеза и оогенеза у млекопитающих (по Курило Л.Ф., в собственной модификации). n – пloidность ($2n$ – диплоидный, $1n$ – гаплоидный набор хромосом), c – количество хроматид в хромосоме.

Характерной особенностью мейоза является то, что репликация ДНК происходит только перед первым мейотическим (*редукционным*) делением. В результате I-го мейотического деления в 2 раза уменьшается количество хромосом, т.е. остается по одной из каждой пары (у человека 23), а в результате второго (*эквационного*) – сестринские хроматид расходятся к полюсам дочерних клеток (схожесть с митотическим делением). Каждое из двух делений мейоза состоит из профазы, метафазы, анафазы и телофазы. В профазе I мейоза происходит спирализация и укорочение хромосом, гомологичные хромосомы конъюгируют друг с другом, образуя бивалент [Богданов, Коломиец, 2007]. У человека аутосомы и хромосомы X – по всей длине, X и Y в норме только в псевдоаутосомных областях, образуя половой (X-Y) бивалент. Во время конъюгации между несестринскими хроматидами может произойти обмен генетическим материалом – кроссинговер, при этом только две хроматиды обмениваются участками, а две участвуют пассивно, месте обмена образуется видимая при световой микроскопии крестообразная структура – *хиазма* (рис. 10).

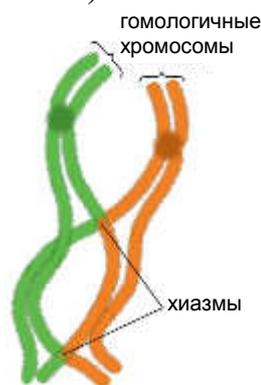


Рис. 10. Схематичное изображение кроссинговера и рекомбинации между несестринскими хроматидами гомологичных хромосом (окрашены различными цветами, зеленым и оранжевым). Указано положение 2 хиазм в длинных плечах хромосом.

Несбалансированный кроссинговер гомологичных хромосом/хроматид приводит к возникновению различных структурных или микроструктурных перестроек (например, делеций, дупликаций и транслокаций). Нарушение расхождения половых хромосом в незрелых половых клетках в ходе митоза, а также первого или второго деления мейоза (отставание в анафазе) приводит к образованию гамет с анеуплоидией [Gardner, Sutherland, 2004; Баранов, Кузнецова,

2007; Gardner et al., 2012]. Нерасхождение половых хромосом в оогенезе и сперматогенезе – частая причина возникновения анеуплоидий (рис. 11).

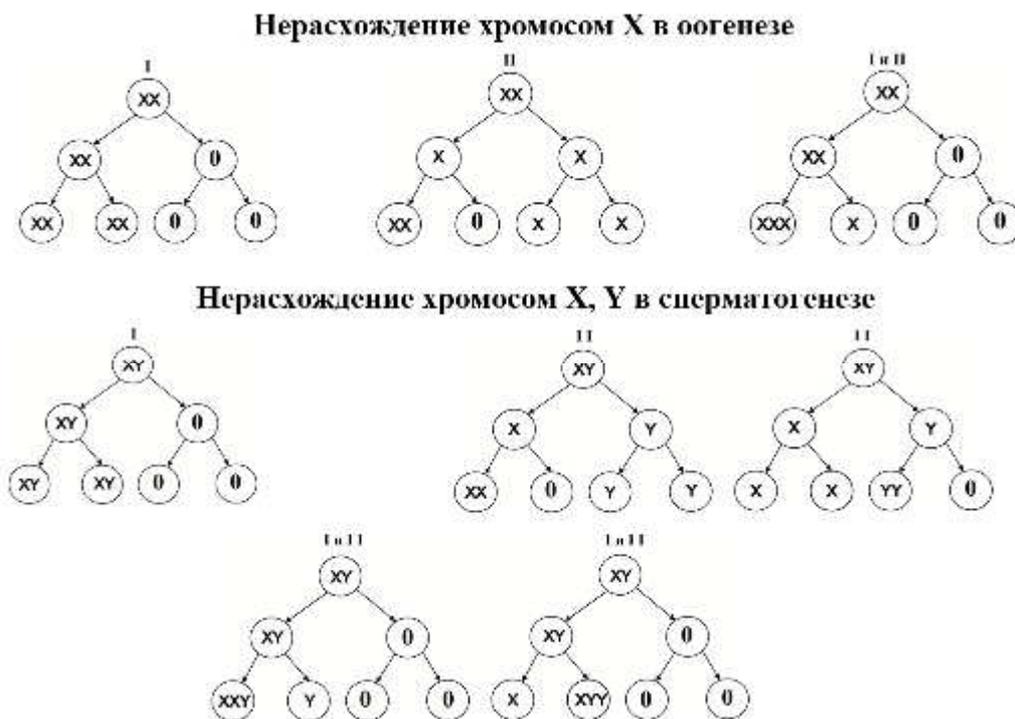


Рис. 11. Механизм возникновения анеусомий половых хромосом в гаметогенезе. При постзиготическом нерасхождении хромосом, например, при делениях дробления у эмбриона, возникает хромосомный мозаицизм, при этом, чем раньше возникает мутация, тем больше может быть процентная выраженность мутантного клона у плода и постнатально.

1.3. Половые хромосомы человека, их аномалии и роль в формировании пола и репродуктивной функции.

Половые хромосомы произошли из пары аутосом и их эволюция насчитывает 300 млн. лет [Charlesworth, 1991; Lahn et al, 2001]. Человек и другие млекопитающие относятся к гетерогаметным живым существам. В норме женских половых клетках присутствуют только хромосомы X, в отличие от них мужские гаметы могут нести как хромосому X, либо хромосому Y. То, что набор половых хромосом (гоносом) в большинстве случаев определяет пол, свидетельствует о важнейшей их роли в детерминации пола, дифференцировке гонад и развития органов половой системы. Они занимают центральное место в генетическом контроле формирования пола за счет наличия в них ряда ключевых генов, обеспечивающих дифференцировку гонад (*SRY*, *DAX-1*), развитие

и функцию органов репродуктивной системы (*AR*, *KALI*, *SOX3*), сперматогенез и оогенез (*BMP15*, *POF1B*, *FMR*, *DBY*, *RBMY*, *TSPY*, *DAZ* и других).

На рисунке 12 показаны идеограммы хромосом X и Y человека с указанием локусов, основных регионов и некоторых генов. На рисунке 1 Приложения 5 и на рисунке 2 Приложения 6 приведены идиограммы (с разрешением 400, 550 и 850 бэндов) хромосом X и Y, соответственно, из руководства ISCN (1995).

Использование ПЦР анализа STS (sequence-tagged sites) маркеров позволило создать карту делеционных интервалов Y-хромосомы, картировать локусы и точки разрыва различных перестроек гоносом [Vollrath et al., 1992]. В 2003 и 2005 гг., соответственно, были секвенированы хромосомы Y и X человека и построены их детальные генетические карты [Skaletsky et al., 2003; Ross et al., 2005].

1.3.1. X-хромосома человека. Инактивация хромосомы X.

Хромосома X человека относится к субметацентрическим хромосомам (рис. 12.), имеет размер около 160 м.п.н. и содержит 1098 различных генов (примерно 4% всех генов человека), 99 из которых экспрессируется в яйцках [Gardner, Sutherland, 2004; Ross et al., 2005]. Описано большое число наследственных X-сцепленных синдромов, 168 из которых, вызваны мутациями 113 генов X-хромосомы. Около 10% (307 из 3199 о данным OMIM) всех менделирующих заболеваний имеет X-сцепленный тип наследования, который может быть как рецессивный, так и доминантный. На X-хромосоме располагается ряд генов, вовлеченных в дифференцировку и развитие половой системы (*AR*, *ATRX*, *DAX-1*, *KALI*, *SOX3*), а также несколько сотен генов, вовлеченных в оогенез или сперматогенез (*BMP15*, *DIAPH2*, *TEX11*, *ZFX*) [Lahn, Page, 1999; Ross et al., 2005].

У млекопитающих при наличии в кариотипе ≥ 2 X-хромосом большая часть генов каждой из последующих X-хромосом инактивируется. Этот механизм эпигенетической регуляции экспрессии X-сцепленных генов называется X-инактивация или лайонизация, согласно фамилии исследователя (Мэри Лайон), предложившего гипотезу о ее существовании [Ohno, 1967]. Благодаря этому у млекопитающих достигается уравнивание дозы X-сцепленных генов, т.е. количества активных генов между самцами и самками. У человека около 15% X-сцепленных генов не подвержены инактивации, в том числе гены дистальной области XAR, в частности региона PAR1, а также другие X-Y гомологичные гены.

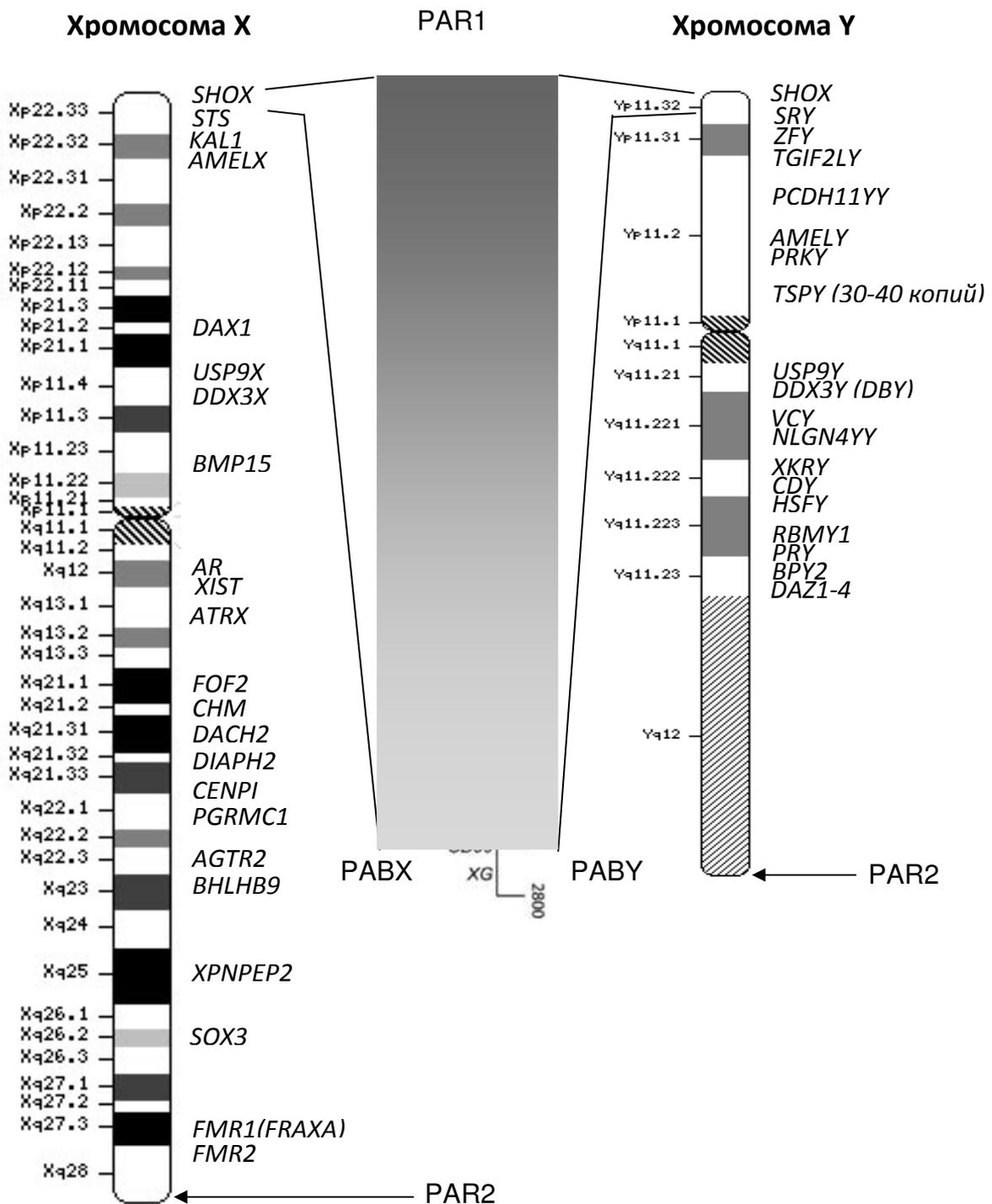


Рис. 12. Идеограммы хромосом X и Y человека с указанием локусов и некоторых генов (слева и справа от каждой хромосомы). Соотношение размера между хромосомами не соблюдено. На выноске – карта псевдоаутосомного региона PAR1, располагающегося в дистальной части коротких плеч гоносом (Xp22.33/Yp11.32). Положение генов PAR1 показано с указанием расстояния в т.п.н. от теломер Xp/Yp. PABX и PABY – граница региона PAR1 на хромосомах X и Y, соответственно. Расположение PAR2 регионов в локусах Xq28 и Yq12 указано стрелками.

Как правило, избегают инактивации эволюционно «молодые» области хромосомы X, тогда как «старые», XCR – инактивируются. Исключением являются гены региона PAR2, инактивирующиеся как на X, так и на Y. Кроме того, некоторые X-сцепленные гены инактивируются неполностью, сохраняя свою активность, которая может зависеть от типа клеток и стадии развития.

На стадии 2-4 бластомеров у мыши происходит инактивация отцовской X-хромосомы по механизму импринтинга [Okamoto et al., 2004]. Полное нарушение лайонизации, например, при делеции или мутации XIC, вызывает у XX-эмбрионов дегенерацию и их гибель до или на стадии имплантации. Процесс лайонизации инициируется из центра X-инактивации (X inactivation center, XIC), располагающегося в локусе Xq13. Механизм лайонизации происходит посредством эпигенетической регуляции с участием продуктов генов *Tsix* и *Xist*. Некодирующая РНК *Xist* изначально экспрессируется на обеих хромосомах X, но затем только с хромосомы, которая становится неактивной (Xi). В ходе процесса инактивации экспрессия *Xist* на активной хромосоме (Xa) снижается, а на инактивированной – повышается. Процессы, возникающие в ходе эпигенетической X-инактивации хромосомы, приводят изменению модификации хроматина и повышению степени компактизации Xi, формируя плотноконденсированный поздне-repliciruyushiy хроматин – тельце Барра.

Важной особенностью лайонизации является отсутствие выборочности в инактивации X-хромосом (отцовской или материнской). Таким образом, все индивидуумы, имеющие в кариотипе 2 и большее число X-хромосом, являются мозаиками по инактивированной(ым) X-хромосомам. В случае выборочной инактивации какой-либо хромосомы (в 70-80% и более клеток) возникает преимущественная лайонизация. Она может встречаться как среди здоровых женщин, так и среди носителей хромосомных мутаций (X-аутосомных и X-Y транслокаций, структурных перестроек и даже точковых мутаций X-хромосомы). Транслокация участка хромосомы, содержащего XIC на аутосому, приводит к инактивации соответствующей аутосомы, в то время как X-хромосомы, не имеющие XIC, остаются активными [Gardner et al., 2004]. При неравномерной инактивации аллелей X-хромосомы, несущих и ненесущих мутацию, возможна различная степень их фенотипического проявления. У женщин с бесплодием и

невынашиванием отмечают повышенную частоту преимущественной X-инактивации, однако ее роль в нарушении репродукции изучена недостаточно.

1.3.2. Псевдоаутосомные (PAR) регионы человека, области X-Y гомологии.

Псевдоаутосомные регионы PAR1 и PAR2 имеют размер 2,7 м.п.н. и 330 т.п.н., и располагаются в дистальных участках короткого и длинного плеча хромосом X и Y соответственно [Page et al., 1987] (рис. 12). К настоящему времени идентифицировано около 30 генов псевдоаутосомных регионов [Flaquer et al., 2008]. Парные гены этих участков гоносом имеют более 99% идентичности [Simmler et al., 1985]. В норме обмен генетическим материалом между хромосомами X и Y, происходящий в профазе I мейоза в сперматоцитах I происходит в пределах псевдоаутосомных регионов, в 95-97% случаев только между PAR1 [Rappold et al., 1994].

Гены PAR1 не подвержены инактивации, поэтому могут рассматриваться как “кандидатные” для нарушений, связанных с их гаплонедостаточностью, например, с синдромом Шерешевского-Тернера. Единственным геном региона PAR1, для которого точно установлена роль в возникновении патологии, является ген *SHOX* (*Short stature Homeobox*) [Ogata et al., 1992; Rao et al., 1997]. Гаплонедостаточность вследствие регулярной или мозаичной моносомии X, делеций и точковых мутации *SHOX* могут вызывать нарушение развития скелета: дисхондроостеоз (синдром Лери-Вейла), деформацию Маделунга и/или низкий рост [Blaschke, Rappold, 2006].

В отличие от PAR1 регион PAR2 подвержен X-инактивации, и его потеря, например, при Yq12 делециях, не вызывает каких-либо патологических состояний [Disteche, 1995]. Частота X-Y мейотической рекомбинаций в PAR2 составляет около 3-5% [Ciccodicola et al., 2000; De Bonis et al., 2006]. У мужчин структурные перестройки гоносом, например, терминальные и интерстициальные делеции Xp22.3 или Yp11.3, захватывающие PAR1 регионы, вызывают в сперматоцитах нарушение конъюгации и рекомбинации хромосом X и Y в ходе профазы I мейоза, приводя к блоку сперматогенеза, секреторной азооспермии и мужскому бесплодию [Mohandas et al., 1992; Jorgez et al., 2011].

Анализ X-Y гомологичных последовательностей выявил помимо псевдоаутосомных регионов ряд областей высокой гомологии между гоносомами, наиболее крупные в локусах: Xp22.3/Yq11.2 и Xq21.3/Yp11.3 (рис. 13, 14).

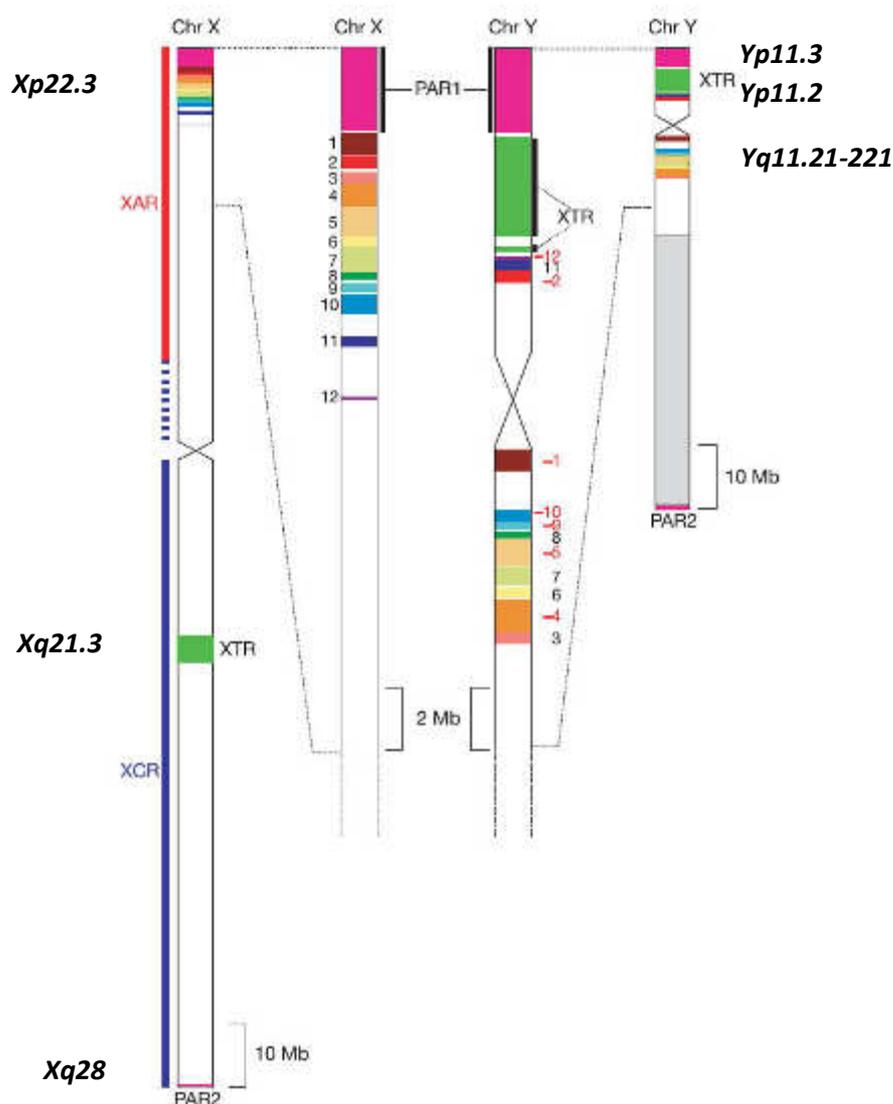


Рис. 13. Наиболее крупные области высокой степени гомологии между половыми хромосомами человека: Xp22.3/Yp11.3 (PAR1), Xp22.3/Yq11.21 (участок Xp проксимальнее PAR1/участок между регионами AZFa и AZFb), Xq21.3/Yp11.3 (XTR, X-translocated region – X-транслоцированный регион) и Xp28/Yq12 (PAR2); XAR, X-added region – X-добавленный регион [Ross M.T. et al., 2005]. Крупный светло-серый блок – гетерохроматин Yq12 и асполагающийся дистальнее него регион PAR2. В центре рисунка в выносках более подробно показаны участки Xp и Yp-Yq. Гомологичные участки XAR окрашены в одинаковый цвет (PAR1 и блоки 1–12). Дупликация и транслокация XTR с хромосомы X на Y произошло в ходе эволюции приматов при дивергенции линий человека и шимпанзе. Номера гомологичных фрагментов XAR-YAR соответствуют номерам, указанным в рисунке 14. Участки, инвертированные на Y-хромосоме соответствующие X-хромосоме, указаны отрицательными цифрами красного цвета.

Помимо генов регионов PAR1 и PAR2 половые хромосомы человека содержат 25 X-Y гомологичных генов: *SOX3/SRY*, *ZFX/Y*, *PRKX/Y*, *RPS4X/Y*, *NLGN4X/Y*, *TGIF2LX/Y*, *PCHDH11X/Y*, *DDX3X/Y*, *USP9X/Y*, *UTX/Y*, *HSFX/Y*, *RBMX/Y*, *EIF1AX/EY*, *SMCX/Y*, *TMSB4X/Y*, *VCX*, *VCX2*, *VCX3A*, *VCX3B/VCY(VCY1B)*, а также пары X-сцепленный ген/Y-сцепленный псевдоген *AMELX/Y*, *KAL1/KALP*, *RBMX/Y*. Пять из этих генов располагается в пределах XAR региона, еще 3 гена в регионе XTR. Предполагается, что 7 других пар генов произошли от прото-гоносом, при этом только 5 из них (*SOX3*, *SMCX*, *RPS4X*, *RBMX* и *TSPYL2*) располагаются на Xq и проксимальной части Xp, а 2 (*HSFX1* и *HSFX2*) на основе высокой степени дивергенции от Y-гомологов отнесены к генам региона XCR [Ross et al., 2005]. Данные участки являются “горячими точками” неаллель-гомологичной рекомбинации (NAHR), которая интенсивно происходит между X-Y гомологами: *PRKX/PRKY*, *TGIF2LX/TGIF2LY*, *PCHDH11X/PCDH11Y*, генами *SHOX*, а также копиями X-сцепленных и копиями Y-сцепленных генов между собой – *HSFX/HSFY*, *VCX*, *VCX2*, *VCX3A*, *VCX3B/VCY (VCY1B)*, приводя к возникновению X-Y транслокаций, терминальных делеций Xp22, микроделеций, микродупликаций и генной конверсии [Rozen et al., 2003; Ross et al., 2005].

Участок Xp22.3 размером 13,7 м.п.н. включает гены *STS*, *VCX-A* и *KAL1* часто связан с терминальными Xp делециями (3,6 м.п.н.) включающими гены *SHOX* и *ARSE*. Терминальные или интерстициальные делеции в Xp22 носят названия *синдрома протяженной делеции*, при этом размер и положение точек разрыва определяют какие гены утрачены и фенотипическое проявление [Dupont et al., 2007].

Недавно исследование генетической вариабельности наиболее протяженного (размер 3,5 м.п.н.) из всех X-Y гомологичных участков у человека, располагающегося в длинном плече хромосомы X (локус Xq21.3) и в коротком плече хромосомы Y (локус Yp11.2) позволило выявить высокую частоту рекомбинаций между их генами-гомологами: *TGIF2LX/Y* и *PCHDH11X/Y* [Veerappa et al., 2013]. Данный участок хромосомы X носит название XTR, X-транслоцированный регион – фрагмент хромосомы X, который был дублирован и транслоцирован по типу инсерции на хромосому Y в ходе эволюции приматов 5-6 млн. лет назад (рис. 13).

XTR характеризуется высоким содержанием тандемных повторов и имеет 98,78 % X-Y гомологии, вследствие которой, а также X-Y рекомбинации, его предложено называть псевдоаутосомным регионом 3, PAR3 [Veerappa et al., 2013].

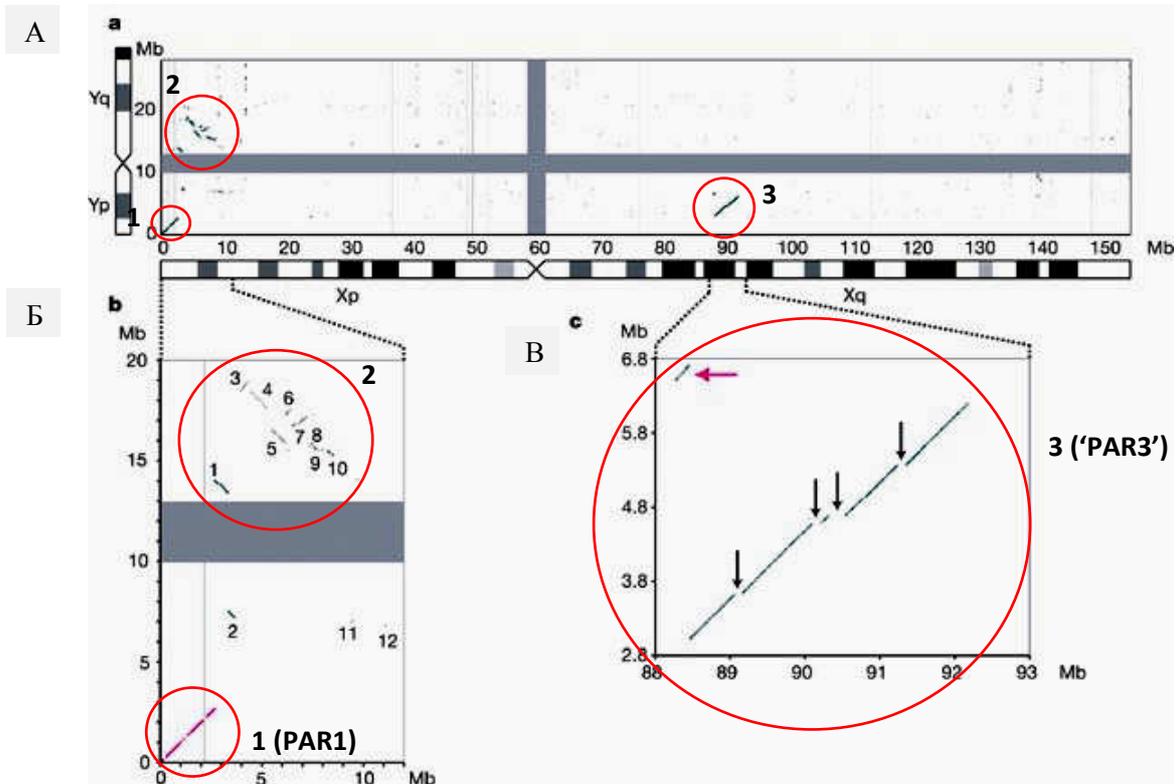


Рис. 14. Области высокой гомологии между X и Y хромосомами человека, BLASTN plot, длина последовательностей ≥ 80 п.н., идентичность $\geq 70\%$) [Ross M.T. et al., 2005].

Примечание: (A) Вверху показана карта перекрестной гибридизации гоносом, слева вверху схематично показана Y-хромосома (без Yq12), в центре – X-хромосома (расположена горизонтально). Серым крестом показаны исключенные из гибридизации центромерные области. Гомология регионов PAR2 не отражена. Красными окружностями обведены области высокой гомологии: 1 – Xp22.3/Yp11.3 (PAR1); 2 – Xp22.3/Yq11.2 и 3 – Xq21.3/Yp11.2 (PAR3). В выносках снизу гомология в Xp22.3, обведена область PAR1 и Xp22.3/Yq11.2 (Б) и в XTR регионе, Xq21.3/Yp11.2 (88-93 м.п.н. и 2.8-6.8 м.п.н. – расстояние от теломер Xp и Yp, соответственно) (В). Числами 1–10 обозначены высоко гомологичные X- и Y-последовательности, меньшая степень гомологии участки 11 и 12, содержащие гены *TBLIX/TBLIY* и *AMELX/AMELY*, Черными стрелками указаны участки прерывания X-Y гомологии в XTR, утраченные на Y-хромосоме, сиреневой стрелкой – короткий сегмент, отделяющий часть XTR региона парацентрической Yp11 инверсией размером 3,5 м.п.н. (инверсионный полиморфизм Y-хромосомы).

1.3.3. Y-хромосома человека.

Хромосома Y – одна из наименьших хромосом у человека и сравнима по длине с хромосомами группы G. Она занимает предпоследнее по размеру место после хромосомы 22, при этом ее величина значительно варьирует в зависимости от размера гетерохроматинового района ее длинного плеча (Yq12). В среднем размер Y-хромосомы человека составляет 60 млн.п.н., что составляет около 2-3% ядерной ДНК гаплоидного генома [Tilford et al., 2001; Skaletsky et al., 2003]. Одной из характерных ее особенностей является наличие протяженного (2/3 от всей хромосомы) гетерохроматинового участка (Yqh), размер которого значительно варьирует как среди мужчин различных популяций. В Y-хромосоме выделяют несколько областей: псевдоаутосомные регионы; эухроматиновые участки Yr и Yq; перичентромерный и дистальный (Yqh/Yq12) гетерохроматин (рис. 12, 13).

Гетерохроматиновая область длинного плеча Y-хромосомы (Yq12) содержит различные типы повторов, наиболее частыми из которых являются повторяющиеся последовательности семейств DYZ1 и DYZ2. В гетерохроматине обнаружены 2 типа мультикопийных последовательностей, имеющих тестис-специфическую экспрессию, с которых транскрибируется некодирующая РНК, подверженная транс-сплайсингу с мРНК аутосомного гена *CDC2L2*, участвующего в контроле клеточного деления и апоптоза [Jehan et al., 2007]. Кроме того, в области перичентромерного гетерохроматина Yq11 обнаружен участок эухроматина, содержащий несколько копий генов семейства *DUX*. Поэтому, принятое ранее мнение, что данные области Y-хромосомы являются генетически инертным, является несправедливым.

Большая часть эухроматина Y-хромосомы не участвует в X-Y рекомбинации, поэтому ее принято называть нерекombинирующей областью Y (Non-recombining region of Y, NRY). В настоящее время этот участок Y-хромосомы обозначают MSY, *Male-specific region of Y*. Эухроматиновая область MSY представляет собой мозаику из различных: X-транслоцированных, X-дегенеративных участков и сегментно дублированных областей (ампликонов), и содержит, по крайней мере, 78 генов, кодирующих 27 различных белков [Skaletsky et al., 2003]. X-транслоцированные последовательности имеют 99% степени идентичности X-хромосоме, а X-дегенеративные последовательности являются “остатками”

древних аутосом (прото-гоносом), из которых в процессе эволюции возникли хромосомы X и Y [Graves, 2006]. Несмотря на общее происхождение и относительно большое число идентичных и гомологичных генов гоносом, по крайней мере, 15 генов на Y-хромосоме не имеют X-гомологов [Ross et al., 2005; Bellot et al., 2014].

Одна из наиболее примечательных особенностей Y-хромосомы человека – протяженный (~30% эухроматина MSY) участок ампликонов самым крупным во всем геноме человека и имеющий одну из самых высоких частот мутаций (рис. 15).

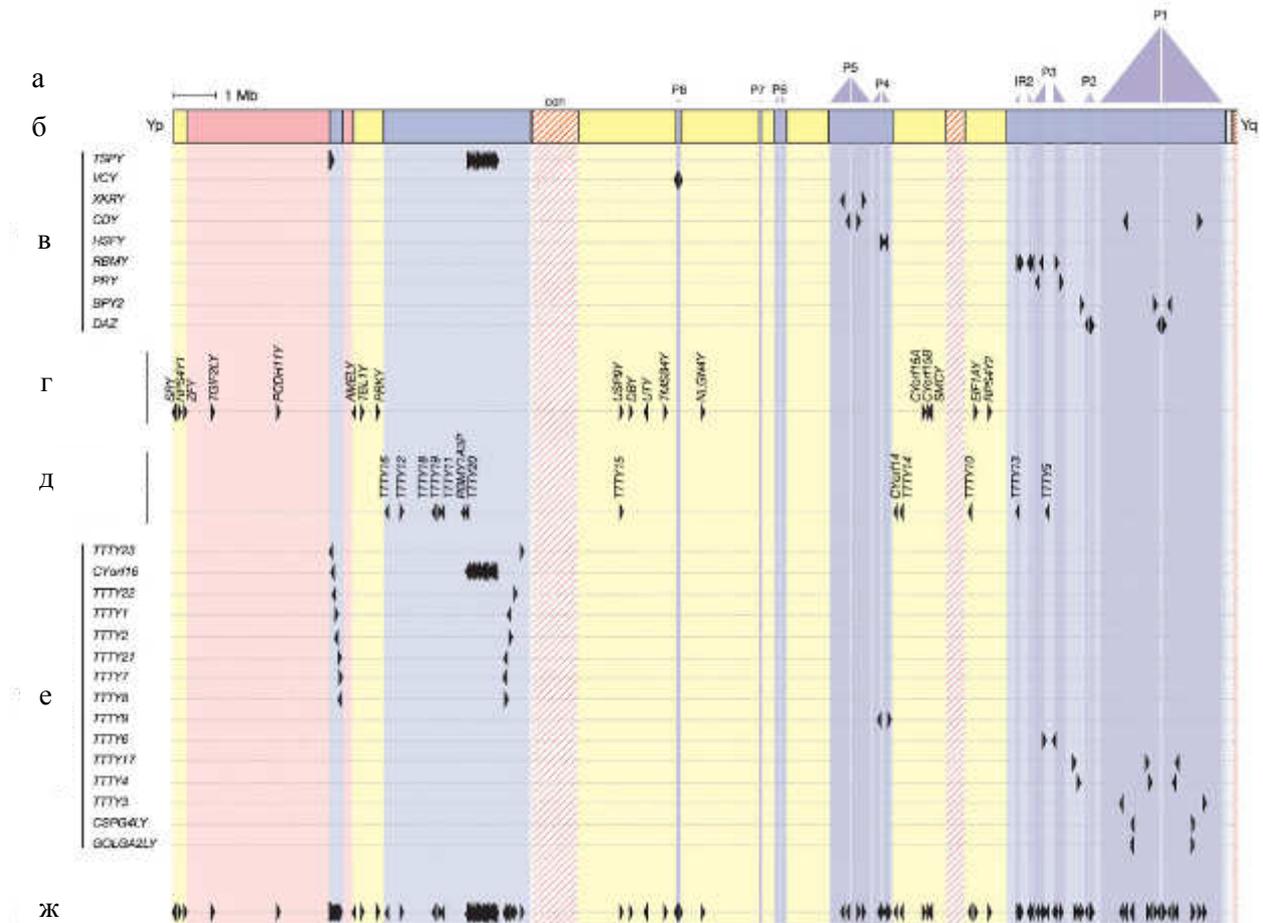


Рис. 15. Структура MSY региона Y-хромосомы человека и его гены. Мозаичность структуры из регионов: X-дегенерирующих (желтые), X-транслоцированного, XTR (розовый), ампликонов (голубые), гетерохроматина (с диагональной исчерченностью) (б). Сверху указан масштаб (1 Mb/м.п.н.), центроммерная область (cen), треугольниками обозначены палиндромы Y-хромосомы (P1–P8) и инвертированные повторы IR2 (а). Интервалы между противоположными сторонами треугольника – недуплицированные спейсерные участки между плечами палиндромов; в) 9 семейств протеин-кодирующих генов; г) протеин-кодирующие гены; д) однокопийные транскрипционные единицы; е) 15 семейств транскрипционных единиц; ж) общая карта генов и транскрипционных единиц в MSY [Skaletsky et al., 2003].

Он включает 8 палиндромов (табл. 6 Приложения), 6 из которых содержат тестис-специфичные гены [Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Repping et al., 2002; Skaletsky et al., 2003]. Плечи палиндромов имеют более 99.9% идентичности, сохраняющейся за счет высокой частоты генной конверсии в гомологичных локусах [Rozen et al., 2003].

Еще одной отличительной особенностью Y-хромосомы человека является большое количество сегментных дупликаций (класс низкокопийных повторов, связанных с вариацией и эволюцией генома). Все 4 пограничных эухроматин/гетерохроматиновых региона Y-хромосомы человека состоят из дублированных последовательностей. Вариации в длине tandemных повторов ограничивается исключительно бета-сателлитными регионами [Skaletsky et al., 2003].

1.3.4. Ген SRY.

Помимо выраженности в гонадах клеточного клона, несущего Y-хромосому, ключевым регулятором, контролирующим дифференцировку гонад по мужскому типу, является ‘тестис-детерминирующий фактор’ (TDF). Он является однокопийным геном *SRY* (*Sex-determining Region Y, пол-детерминирующий регион Y*), располагающимся в дистальной части короткого плеча Y-хромосомы (локус Yp11.31) вблизи границы PAR1 и MSY региона [Sinclair et al., 1990]. Белок, кодируемый данным геном, участвует в регуляции транскрипции генов, реализующих дифференцировку клеток Сертоли и развитие яичек [Koorman et al., 1990; 1991]. Делеции или мутации гена *SRY* в большинстве случаев ведут к полной (“чистой”) форме XY- дисгенезии гонад – синдром Свайера [Berta et al., 1990; Jager et al., 1990; McElreavey et al., 1992; Осипова, 1997] или неполной форме XY- дисгенезии гонад [Domenice et al., 1998]. Потеря гена *SRY* может быть обусловлена структурной перестройкой Y-хромосомы: r(Y), i(Yq) и idic(Yq), транслокациями и делециями/микроделециями Yp11.

1.3.5. Локус AZF (‘фактор азооспермии’).

Большая часть генов длинного плеча Y-хромосомы человека вовлечена в контроль созревание мужских половых клеток, поэтому утрата эухроматина Yq11.2 часто приводит к нарушению сперматогенеза и мужскому бесплодию. Этот участок

был назван ‘фактор азооспермии’ - Azoospermia Factor, AZF [Tiepolo, Zuffardi, 1976]. С появлением методов молекулярного анализа было подтверждено присутствие в нем генов (рис. 16), контролирующих дифференцировку мужских половых клеток, для каждого из которых выявлены гены-кандидаты, участвующие в контроле сперматогенеза, а также их X-сцепленные и/или аутосомные гомологи [Skaletsky et al., 2003].

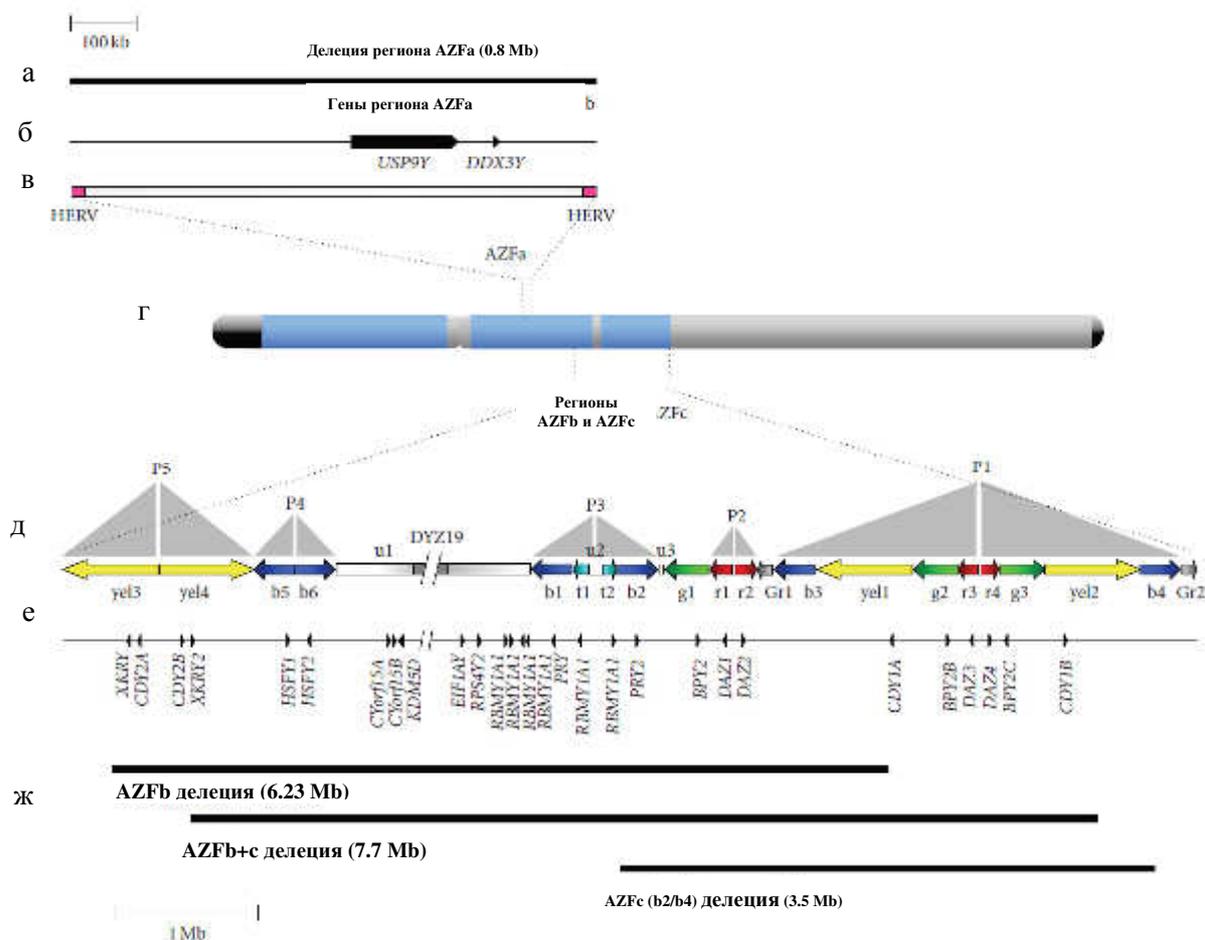


Рис. 16. Схематичное изображение Y-хромосомы человека с локализацией AZF регионов и типов полных AZF делеций [Navarro-Costa et al., 2010].

Примечание: Сверху вниз: а – делеция AZFa; б – схематичная карта AZFa региона с указанием его генов (*USP9Y* и *DDX3Y*); в – положение копий последовательностей эндогенного вируса герпеса 15 (HERV), фланкирующих регион AZFa, рекомбинация между которыми приводит к микроделеции и микродупликации данного региона; г – схематично показана Y-хромосома человека, черным цветом указаны псевдоаутосомные PAR1 и PAR2 регионы, серым – гетерохроматин, голубым – эухроматин; на выноске ниже (д) – карта ампликонов (показаны разноцветными стрелками) и палиндромов P1-P5 (показаны серыми треугольниками); е – карта генов регионов AZFb и AZFc и различные их полные делеции (ж). Размеры делеций указаны, шкалы размеров приведены сверху – 100 Kb (т.п.н.) и снизу – 1Mb (м.п.н.).

Тестис-специфичные гены AZF региона представлены как однокопийными генами, так и генными семействами (в норме от 2 до 6 копий генов) и разного количества псевдогенов, имеющих идентичность около 99% (табл. 7 Приложения). Согласно размерам и расположению делеций длинного плеча Y-хромосомы выделено 3 (суб)региона: AZFa, AZFb и AZFc [Vogt et al., 1996]. Картирование и секвенирование точек разрыва позволили определить размеры и механизм возникновения различных типов AZF делеций, указать на частичную перекрываемость регионов AZFb и AZFc [Ferlin et al., 2003; Skaletsky et al., 2003].

AZF делеции возникают в результате несбалансированной неаллельной гомологичной рекомбинации (NAHR): между копиями эндогенного ретровируса HERV15 (делеции AZFa); палиндромом P5 и проксимальным плечом палиндрама P1 (делеции AZFb); палиндромами P5 и P4, а также проксимальными и дистальными плечами палиндрама P1 (AZFb+c делеции); прямыми повторами b2 и b4 (полные AZFc делеции) [Sun et al., 2000; Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Repping et al., 2002].

1.3.6. Полиморфизм Y-хромосомы.

Хромосома Y относится к наиболее варьирующим хромосомам человека. Ее цитогенетически видимые вариации (гетероморфизм) обусловлены полиморфизмом ее гетерохроматинового участка Yq12, размер которого значительно варьирует среди мужчин различных этнических популяций. У мужчин из популяций Европы гетерохроматин длинного плеча Y-хромосомы, который составляет около 40 м.п.н., т.е. 2/3 от всей ее длины [Назаренко, 1993; Gardner, Sutherland, 2012].

Другим видом гетероморфизма Y является инверсионный полиморфизм. Большинство носителей перичентрических инверсий Y фертильны и могут передать ее сыну, что свидетельствует о стабильности и об отсутствии негативного влияния на сперматогенез и репродуктивную функцию у мужчин [Gardner, Sutherland, 2012]. Так, перичентрическая инверсия в локусе Yp11.2, встречающаяся у 1/3 мужчин Европы, является одним из наиболее распространенных полиморфизмов Y-хромосомы [Tilford et al., 2001]. Кроме того, описаны различные полиморфные микроструктурные перестройки Y (парацентрические инверсии, микроделеции и микродупликации), которые не могут быть выявлены только с помощью молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов [Jobling et al.,

1996; 1998; 2006]. Некоторые из полиморфизмов Y-хромосомы «нейтральны», другие – могут являться фактором риска нарушения сперматогенеза и мужской фертильности или предрасполагать к структурным перестройкам половых хромосом в мейозе [Jobling et al., 1998], однако влияние многих микроструктурных перестроек остается недостаточно изученным.

Еще один вид полиморфизма Y-хромосомы человека обусловлен различием по количеству копий мультикопийных генов, например, наличие варьирующего по числу копий кластера *TSPY*, располагающегося в локусе *гонадобластомы* (*GCY*). Гены *TSPY* располагаются в виде протяженного блока из тандемно составленных 30-60 копий. Показано, что для нормального сперматогенеза мужчин их количество не должно быть низким или чрезмерно высоким, а выраженные отклонения от среднего количества – фактор риска нарушения репродуктивной функции [Vodicka et al., 2007].

1.3.7. Рекомбинация половых хромосом и механизмы образования их структурных перестроек.

Большинство хромосомных абераций возникает в ходе мейотического деления половых клеток, реже они могут происходить после образования зиготы [Gardner, Sutherland, 2004]. Мутации половых хромосом могут возникать в результате рекомбинации, возникающей между негомологичными хромосомами (аутосомой и гоносомой) или гомологичными (X, Y) хромосомами.

Аномальная рекомбинация является причиной различных структурных мутаций половых хромосом, например, гоносомно-аутосомных и гоносомных транслокаций, делеций и дицентриков [Yen et al., 1990; 1991; Weil et al., 1994; Repping et al., 2002; Lange et al., 2013]. На рисунке 17 показаны межхроматидная и внутрехроматидная Y-Y рекомбинация и ее продукты. Рекомбинация Y-хромосомы может происходить через кроссинговер (CO) и быть сбалансированной, тогда сестринские хроматиды остаются неизмененными или с одна из хроматид будет иметь парацентрическую инверсию, либо быть несбалансированной, приводя к образованию хроматид с делецией и дупликацией, изодицентрической Yp хромосомы с ацентрическим фрагментом [Lange et al., 2013]. Рекомбинация, происходящая не путем кроссинговера может вызывать генную конверсию, NCO.

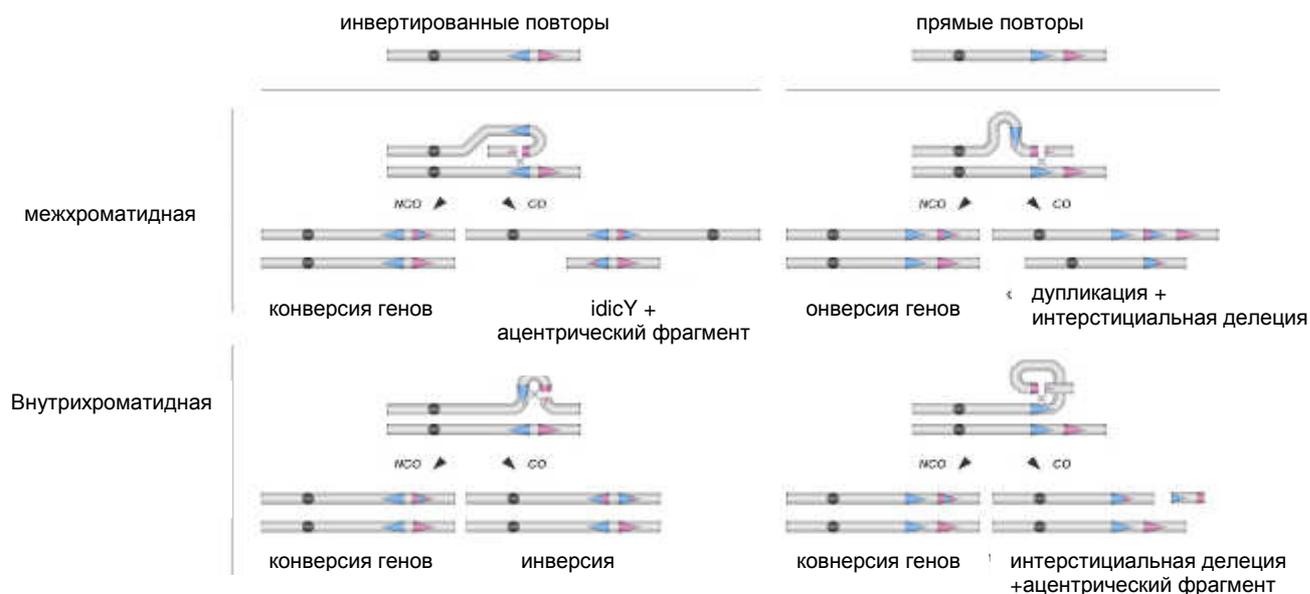


Рис. 17. Механизмы межхроматидной (между сестринскими хроматидами) и внутрихроматидной рекомбинации и их продукты в зависимости от расположения (прямоое или инвертированное) повторов, участвующих в рекомбинации.

Примечание: CO – кроссинговер, NCO – генная конверсия [Lange et al., 2013].

1.4. Аномалии половых хромосом.

Мутации гоносом могут быть численные (анеусомии), структурные (цитогенетически идентифицируемые и микроструктурные перестройки), мозаицизм по половым хромосомам и химеризм, эпигенетические (нарушение инактивации хромосомы X, однородительская дисомия по гоносомам), а также их сочетание [Лебедев, 2012]. Аномалии гоносом имеют различные фенотипические последствия: от отсутствия влияния на репродуктивную систему до тяжелых форм нарушения дифференцировки гонад, аномалий полового развития и бесплодия. Их эффект в значительной степени определяется типом мутации(й) и их выраженностью, представленностью долей клеток, несущих мутации (в случае мозаицизма). В тех случаях, когда половые клетки, участвовавшие в оплодотворении, несут мутации половых хромосом, либо эти мутации возникают на ранних этапах эмбрионального развития, они могут быть унаследованы плодом [Баранов, Кузнецова, 2007]. Исключением составляют те гоносомные мутации, которые не совместимы с развитием и жизнеспособностью эмбриона/плода. Например, отсутствие хромосомы X (кариотип 45,Y) возникающее при оплодотворении нулесомного по гоносомам ооцита Y-несущим сперматозоидом, или полное нарушение включения механизма инактивации хромосомы X у

эмбрионов женского пола (46,XX) несовместимо с эмбриональным развитием и являются летальными мутациями [Бочков, 2002].

1.4.1. Численные аномалии половых хромосом.

Аномалии половых хромосом обнаруживают с частотой примерно 1 на 250-300 новорожденных, и в первую очередь они представлены количественными изменениями половых хромосом, в частности кариотипами: 45,X, 47,XYY, 47,XXX и 47,XXY [Давиденкова и др., 1973; Linden et al., 1995; 2002; Бочков, 2002; Баранов, Кузнецова, 2007]. Количественные нарушения половых хромосом в отличие от аутосомных анеуплоидий, в большинстве случаев не нарушают жизнеспособность эмбриона/плода, но они связаны с различными гоносомными синдромами (табл. 1).

Таблица 1

Численные мутации половых хромосом и связанные с ними синдромы.

Гоносомные анеуплоидии	Кариотип (при регулярной форме)	Частота встречаемости	Название синдрома	Фенотипический пол
Моносомия:				
Моносомия X	45,X	1:2500 женского пола	Синдром Шерешевского-Тернера, СШТ	женский
Трисомии:				
Трисомия X	47,XXX	1 на 1000-2000 женского пола	трипло X, трисомия X	женский
Дисомия Y	47,XYY	1 на 1000-1500 мужского пола	“синдром супермужчина”	мужской
Дисомия X у (Y+) мужчин	47,XXY	1 на 600 мужского пола	синдром Клайнфельтера	мужской
Тетрасомии:				
Тетрасомия X	48,XXXX	Редко	тетра X, тетрасомия X	женский
Тетрасомия по гоносомам у мужчин	48,XXXU	Редко	вариант синдрома Клайнфельтера	мужской
	48,XXYY	Редко	синдром 48,XXYY, вариант синдрома Клайнфельтера	мужской
	48,XYYY	Крайне редко	Трисомия Y	мужской
Пентасомия:				
Пентасомия X	49,XXXXX	Крайне редко	тетра X, тетрасомия X	женский
Пентасомия по гоносомам у мужчин	49,XXXXY	Крайне редко	редкий вариант синдрома Клайнфельтера	мужской
	49,XXXYY	Крайне редко	редкий вариант синдрома Клайнфельтера	мужской
	49,XXYYY	Крайне редко	трисомия Y, редкий вариант синдрома Клайнфельтера	мужской
	49,XYYYY	Крайне редко	тетрасомия Y	мужской

Тетрасомия и пентасомия по половым хромосомам встречаются значительно реже, в большинстве случаев они были описаны как клинические случаи. Они встречаются чрезвычайно редко с частотой 1:18.000—1:100.000. Среди них описаны следующие кариотипы: 48,XXXX, 49,XXXXX, 48,XXYY, 48,XXXY, 49,XXXXY, 49,XXXYY, 48,XYYY, 49,XYYYY и 49,XXYYY [Schinzel, 2001; Ворсанова и др. 2006; Gardner et al., 2012]. Изменение количества половых хромосом могут быть регулярными (немозаичными) и нерегулярными (мозаичными).

Следует отметить, что дисомия и полисомия по хромосоме X или Y могут быть обусловлены не только изменением количества соответствующих гоносом, но и наличием некоторых типов структурных перестроек гоносом (изодицентрические хромосомы X и Y с точками разрыва в дистальной части PAR1, изодицентрические Yr хромосомы в точками разрыва в Yq12 или дистальной части эухроматина длинного плеча, локус Yq11.23).

1.4.2. Гоносомный мозаицизм. Изодисомия по половым хромосомам.

Мозаицизм – биологическое явление, характеризующееся наличием у многоклеточного организма двух или более клеточных линий (клонов) с различными геномами, имеющих общее происхождение, т.е. происходящие из одного генома зиготы. Мозаик – организм, несущий две или более клеточных линии (клона) с различными геномами (генотипами). Мозаицизм по половым хромосомам может быть явный и скрытый. Явный мозаицизм детектируется при стандартном цитогенетическом исследовании, скрытый – с помощью молекулярно-цитогенетических (например, FISH, микроматричный анализ хромосом) и/или молекулярно-генетических методов (например, ПЦР, ДНК-гибридизации, MLPA). В случаях наличия у одного индивидуума трех и более клеточных клонов мозаицизм является *сложным*. Различия в клеточных клонах может быть как по нормальным, так и по перестроенным хромосомам, по генным мутациям, а также эпигенетическим изменениям. Мозаицизм, характеризующийся присутствием различных структурных перестроек одной и той же хромосомы, возникших повторно (симультанно), называют *динамическим*. В результате динамического мозаицизма возникает сложный мозаицизм с наличием клеточных линий, несущих различные

мутации, например, с изохромосомой Yp и с терминальной делецией Yq [Iourov et al., 2008].

Мозаицизм 46,XX/46,XY может являться химеризмом, обозначаемом в кариотипе предлогом 'chi' (chimerism), либо мозаицизмом по половым хромосомам с наличием двух (мажорных) клонов, возникших в результате нерасхождения половых хромосом из-за отставания в анафазе митоза – феномен восстановления из трисомии ('trisomy rescue') в зиготе, имевшей кариотип 47,XXY [Dewald et al., 1980; Wit et al., 1987; Niu et al., 2002; Conlin et al., 2010]. Восстановление из трисомии – генетическое явление, характеризующееся восстановлением эуплоидности при трисомии путем постзиготической потери дополнительной хромосомы [Лебедев, 2012; Gardner, et al., 2012]. В случае селективной потери разных половых хромосом также возникает гоносомный мозаицизм.

При презиготической потере (нулесомии) половых хромосом в гамете одного и наличие дисомии по гоносомам в гамете другого родителя возможно образование зиготы с *однородительской дисомией* (ОРД) по гоносоме(ам): генотипы XmatXmat, XpatXpat и XpatYpat. Возникновение ОРД по гоносомам также возможно при ранней постзиготической потере гоносомы у эмбриона с трисомией по гоносомам (47,XXX; 47,XXY) в результате восстановления из трисомии, или постзиготическом нерасхождении гоносом. В результате ОРД по гоносомам у дочери может быть изодисомия или гетеродисомия по материнской хромосоме X, а сын может унаследовать от отца хромосомы X и Y. В литературе описан случай передачи X-сцепленного заболевания от отца сыну [Ferrier et al., 2009].

1.4.3. Химеризм.

Ошибки оплодотворения могут быть приводить к образованию химерных зигот, несущих геномы различного происхождения [Boklage, 2006; Malan et al., 2006]. Химеризм – биологическое явление, характеризующееся наличием в организме двух, реже более линий клеток, несущих геномы разного происхождения, т.е. происходящие от разных геномов одной или более зигот [Gardner, Sutherland, 2004].

У человека химеризм может возникать на разных стадиях онтогенеза: в момент оплодотворения, эмбрионального развития или постнатально, в том числе во взрослом возрасте, однако влияние на репродуктивную систему может оказывать

только химеризм возникший в результате аномалий оплодотворения или ранних стадий эмбрионального развития [Strain et al., 1995; Golubovsky, 2003]. В тех случаях, когда химеры имеют одинаковый набор хромосом ('изокариотипные' химеры), и отсутствуют цитогенетически определяемые хромосомные мутации, кариотип человека будет нормальный мужской (46,XY) или нормальный женский (46,XX). При отсутствии мутаций, нарушающих развитие половой системы, нарушение формирования пола у таких индивидуумов не происходит. Если у химер имеются различные по набору хромосом клоны клеток ('гетерокариотипные' химеры), часто происходит нарушение дифференцировки гонад и развития половой системы.

У большинства химер 46,XX/46,XY выявляют истинный гермафродитизм [Uehara et al., 1995], однако спектр фенотипов простирается от женского до мужского [Schoenle et al., 1983; Sugawara et al., 2005]. Помимо этого у химер, встречаются и другие фенотипические проявления: мозаичная окраска кожи и глаз, наличие двух популяций эритроцитов, что может приводить к неправильному определению группы крови, у химер с триплоидией – врожденные пороки развития [van Dijk et al., 1996].

1.4.4. Структурные аномалии половых хромосом.

Описано большое количество структурных аномалий, как сбалансированных, так и несбалансированных структурных аномалий половых хромосом человека, а также аутосомно-гоносомных перестроек [Gardner, Sutherland, 2004; Gardner et al., 2012; Schinzel, 2001]. Их генетические эффекты и фенотипические проявления разнообразны (от нейтрального до нарушения фертильности, тяжелых форм нарушения формирования пола и множественных пороков развития) и зависят от типа перестройки, наличия и выраженности мозаицизма.

Некоторые структурные перестройки хромосомы X оказывают настолько негативное влияние на развитие эмбриона/плода, что несовместимы с его развитием и жизнеспособностью, например, полная нуллисомия X и ее некоторые aberrации. Вследствие потери локуса XIC (Xq13) постнатально практически не встречаются такие структурные перестройки X-хромосомы, как изохромосома по короткому плечу – i(Xp), некоторые типы X-X транслокаций и дицентрические хромосомы X по короткому плечу с точками разрыва проксимальнее центра импринтинга. Делеции

некоторых X-сцепленных генов (кроме псевдоаутосомных регионов) у плодов мужского (46,XY) пола из-за отсутствия другого аллеля X-хромосомы летальны из-за пороков развития, несовместимых с жизнью, например, синдромы MLS, Aicardi, Goltz [van den Veyver 2002].

В наиболее крупномасштабном обзоре цитогенетически идентифицированных структурных перестроек Y-хромосомы проведен анализ более 600 постнатально и пренатально диагностированных случаев аномалий Y-хромосомы, за исключением регулярной дисомии Y – 47,XY₂ [Hsu, 1994]. Особое место в данном обзоре было уделено оценке гено-фенотипических корреляций при структурных перестройках с вовлечением Y-хромосомы ли ее материала, а также мозаицизма по хромосоме Y. Так, для мозаицизма по Y-хромосоме (например, X/XY, X/XY₂ и X/XY/XY₂) показано различие между фенотипами пре- и постнатально диагностированных пациентов. Практически во всех постнатальных случаях отмечены фенотипические изменения нарушения формирования пола или репродукции, тогда как в 90% пренатальных случаях у плодов отмечали нормально развитые по мужскому полу половые органы [Hsu, 1989; 1994; Chang et al., 1990]. Для ряда структурных перестроек Y-хромосомы показана выраженная фенотипическая вариабельность (клинический полиморфизм), что обусловлено сохранностью ее короткого (Yp), в частности гена *SRY*, и/или длинного плеча (Yq), а также наличия, типа и выраженности гоносомного мозаицизма [Черных, 2007].

В значительной доле случаев возникновение цитогенетически идентифицируемых несбалансированных перестроек (за исключением большинства инверсий) Y-хромосомы вызывает митотическую ее нестабильность, и как следствие ее потерю в части клеток – появлением клеточного клона 45,X [Hsu, 1994]. Это ведет к X/XY мозаицизму, характеризующегося различным фенотипическим проявлением от бесплодия у мужчин до тяжелых форм двойственности полового развития [Reddy, Sulcova, 1998]. Наличие и выраженность клона, несущего Y-хромосому в гонадах является одним из определяющих факторов в дифференцировке гонад. Однако важно помнить, что выраженность мозаицизма X/XY при исследовании лимфоцитов периферической крови у многих пациентов не коррелирует со степенью маскулинизации [Rosenberg et al., 1987; Telvi et al., 1999].

Одним из наиболее частых типов структурных аномалий гоносом являются *изохромосомы* и *изодицентрические хромосомы X и Y*. Они возникают в случае образования симметричной хромосомной структуры, несущей 2, реже большее количество центромер. В зависимости от расположения точек разрыва изодицентрические хромосомы могут быть изодицентриками по короткому или длинному плечу. Изохромосомы являются результатом симметричного соединения двух копий плеч при разрыве хромосомы в ее центромерной области. Это может быть вызвано нарушением деления центромеры или транслокацией двух гомологичных хромосом, вовлекающей их прицентромерные регионы.

Изодицентрические хромосомы возникают (рис. 18) в случае разрыва в одном из плеч хромосомы, за которым следует дупликация хроматид и их соединение со стороны точки разрыва [Tuck-Muller et al., 1995; Stuppia et al., 1996; Stankiewicz et al., 2001]. Однако в некоторых случаях образование изохромосом Yp может происходить не через формирование U-образной структуры, возникающей при рекомбинации между повторяющимися последовательностями, в результате инверсий/дупликаций Y-хромосомы [Sheth et al., 2009].

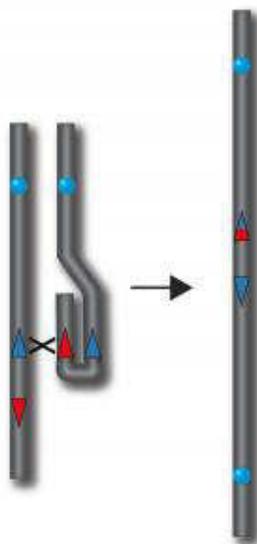


Рис. 18. Схема образования изодицентрической хромосомы Yp (idicYp).

Примечание: Голубым кружком показана центромера, красной и синей стрелками – гомологичные последовательности/повторы длинного плеча хромосомы Y, участвующие в Y-Y рекомбинации, в результате которой образуется изодицентрик Yp.

Кроме того, в 55% случаев изохромосом Xq точки разрыва располагаются не в центромерной области, а в проксимальной части локуса Xp11, что указывает, что в действительности данные перестройки представляют собой idic(Xq) хромосомы [Koumbaris et al., 2011]. Точки разрыва idic(Yp) хромосом, как правило, располагаются в локусе Yq11.2 и крайне редко в локусе Yq12. Примерно в 50% случаев картированы в регионе AZFb или проксимальнее, и в 50% – в регионе AZFc, при этом механизм их возникновения связан с аномальной рекомбинацией палиндромов Y-хромосомы [Lange et al., 2013].

Другим типом перестроек являются *кольцевые хромосомы X и Y*, их образование вызвано соединением двух разрывов в разных плечах одной, крайне редко разных хромосом [Grass et al., 2000; Gardner et al., 2012]. Для кольцевых Y-хромосом характерны терминальные делеции Yq с захватом всего дистального гетерохроматина. Поэтому для анализа их происхождения (X или Y) кольцевых гоносомы часто приходится использовать молекулярно-цитогенетическое или молекулярно-генетическое исследование [Henegariu et al., 1997].

Фенотипический спектр индивидуумов с изохромосомам, изодичетриками и кольцевыми половыми хромосомами простирается от женского с СШТ или его признаками, интерсексуального до мужского [Hsu, 1994; Schinnzel, 2001]. Главными факторами, определяющими характер полового развития при этом, являются тип перестроенной гоносомы, а в случае Y-хромосомы – наличие гена *SRY*, а также степень выраженности X/X_Y мозаицизма в гонадах [Lin et al., 2005]. Более чем у 70% пациентов при этом отмечали X/X_Y мозаицизм, а в некоторых случаях обнаружена кольцевая дицентрическая Y-хромосома в сочетании с различными клонами. Это вызвано нестабильностью r(Y) в процессе клеточного деления и как следствие ее потере в части клеток, ведущей к возникновению клона 45,X [Arnedo et al., 2005; DesGroseilliers et al., 2006]. В 89% случаев немозаичной и 40% случаев мозаичной формы кольцевой Y-хромосомы отмечено развитие гениталий по мужскому типу, а в половозрелом возрасте – бесплодие вследствие азооспермии [Hsu, 1994]. Наличие женского и интерсексуального фенотипа наблюдали у 36% и 24% пациенток с мозаичной формой r(Y), соответственно, при этом практически у всех индивидуумов отмечен низкий рост, а у многих – клинические признаки, характерные для синдрома Шерешевского-Тернера. В

данном случае низкий рост может быть обусловлен наличием, в том числе скрытого X/Y мезаицизма, а также делецией терминальной части Yp, захватывающей ген *SHOX*. Кроме того, в участке Yq11.21 проксимальнее региона AZFa предположено наличие локуса, контролирующего рост – *GCTY*. Однако до настоящего времени, подобный ген не был обнаружен [Kirsch et al., 2000; 2005].

Инверсии половых хромосом относятся к сбалансированным хромосомным перестройкам. Различают парацентрические и перичентрические инверсии, возникающие, соответственно, если точки располагаются в пределах одного плеча или на разных плечах одной хромосомы. Из-за небольшого размера парацентрические инверсии Y-хромосомы крайне не выявляют при цитогенетическом исследовании, и могут быть обнаружены только с использованием молекулярных или молекулярно-цитогенетических методов исследования. Перичентрические инверсии могут быть выявлены при стандартном цитогенетическом анализе, однако следует помнить, что метацентрические Y-хромосомы могут быть неправильно расценены как инверсии. Дифференциальными признаками, позволяющими отличить ‘истинные’ инверсии от ‘ложных’ (Y-дицентрических хромосом) являются характер гибридизации центромеры и митотическая стабильность Y-хромосом. Перичентрические инверсии Y гетерогенны, т.е. неодинаковы по размеру и точкам разрыва [Knebel et al., 2011]. Механизм возникновения перичентрических инверсий связан с образованием точек разрыва в коротком и длинном плечах и инверсией фланкируемого ими фрагмента хромосомы на 180° с последующим соединением точек разрыва.

Перичентрические Y-инверсии относительно редки в общей популяции. Частота их встречаемости составляет примерно 1-2 на 1000 [Verma et al., 1982; Shapiro et al., 1984; Toth et al., 1984]. Хотя Y-инверсии были описаны у пациентов с различными хромосомными аномалиями, например, с трисомией 21, синдромом Клайнфельтера или другими хромосомными аномалиями [Sparkes et al., 1970; Rivera et al., 2002], в большинстве случаев они не имеют фенотипических эффектов и не увеличивают риск рождения детей с аномалиями развития. В единичных случаях перичентрические инверсии Y-хромосомы с точкой разрыва в Yp11

дистальнее локуса *SRY* нарушению приводят к XY-дисгенезии гонад [Gimelli et al., 2006].

X-Y транслокации являются редкими типам хромосомных аномалий. Xp;Yq транслокации часто имеют семейный характер, и как правило, передаются сыновьям от матерей-носителей транслокаций фертильны и имеют нормальный интеллект. У пациентов мужского пола имеет место частичная нулесомия по локусам, располагающимся дистальнее локализации точки разрыва в коротком плече X-хромосомы. При этом фенотип зависит от их локализации – умственная отсталость, низкий рост, хондродисплазия, ихтиоз, и другие нарушения, характерные для делеций Xp22, как при «синдроме протяженной делеции» [Frints et al., 2001]. Реже обнаруживают Xp;Yp и Xp;Yq транслокаций и крайне редко – Xq;Yp и Xq;Yq транслокации [Cameron et al., 1984; Kelly et al., 1984; Bernstein et al., 1987; Hsu, 1994; Delon et al., 1997; Lissoni et al., 2009; Gardner et al., 2012].

Аномальный обмен между короткими плечами хромосом X и Y в мейозе I в ходе сперматогенеза отца приводит к образованию транслокации. Рекомбинация с точками разрыва, располагающихся прокисмальнее границы PAR1 регионов, наиболее часто возникает между генами *PRKX* и *PRKY*, приводя к образованию дериватных (SRY+)X-хромосом и (SRY-)Y-хромосом [Schiebel et al., 1997]. Оплодотворение сперматозоидами, несущих данные дериваты, вызывает у потомства SRY+XX инверсию пола и SRY-XY-инверсию пола, соответственно (рис. 19).

Перестройки с вовлечением аутосом и половых хромосом являются не частыми aberrациями. В большинстве случаев они представлены *гомосомно-аутосомными транслокациями*: сбалансированными реципрокными или несбалансированными. В случае сбалансированных X-аутосомных транслокаций все мужчины имеют тяжелое нарушение сперматогенеза (азооспермию) и бесплодие. У женщин репродуктивная функция может быть сохранена, степень фенотипического проявления у них может влиять характер инактивации X-хромосомы и точки разрыва [Gardner et al., 2012]. В редких случаях транслокаций материала Y-хромосомы на аутосому приводят к кариотипам 45,X и 46,XX у мужчин [Hsu, 1994].

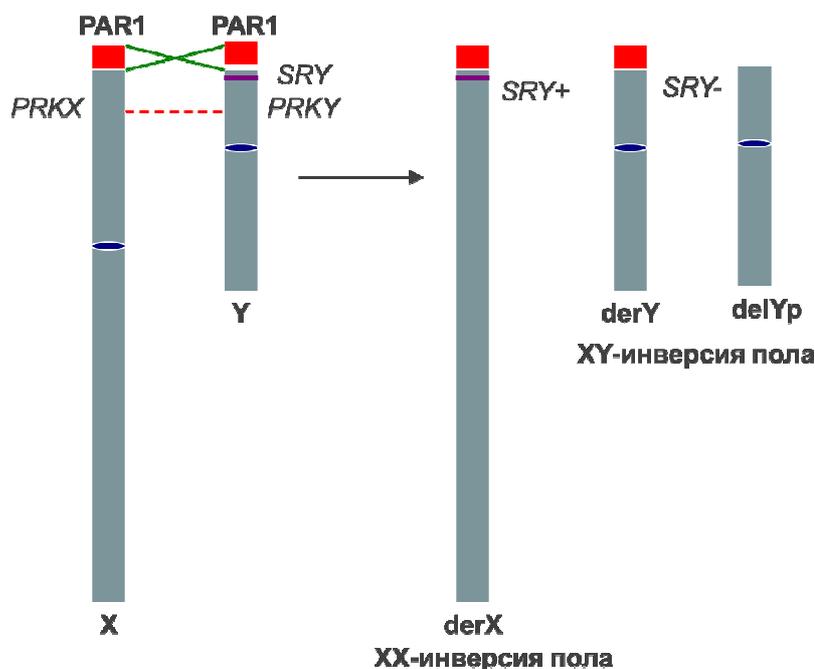


Рис. 19. Аномальная рекомбинация Xp22.3/Yp11.3 – наиболее частый механизм Xp;Yp транслокаций и терминальных делеций Yp11 с вовлечением гена *SRY*.

В литературе сообщали редкие случаи *терминальных делеций* короткого плеча Y-хромосомы (del Yp11), во всех случаях они захватывали ген *SRY* (Hsu, 1994). Больные имели женский фенотип, дисгенезию гонад и признаки синдрома Шерешевского-Тернера (СШТ). Последнее обстоятельство отличает Yp- женщин от пациенток с XY-дисгенезией гонад, у которых отсутствуют клинические признаки СШТ. Предполагают, что роль ‘анти-Тернеровских’ могут выполнять гомологичные гены *ZFX* и *ZFY*.

Делеции длинного плеча Y-хромосомы встречаются значительно чаще, чем делеции ее короткого плеча. Их обнаруживают в регулярной форме или в сочетании с X/XY мозаицизмом. Наличие мужского фенотипа отмечается у 92% индивидуумов с регулярной (кариотип 46,X,del(Y)(q11)) и 34% индивидуумов с мозаичной формой делеции – mos 45,X46,X,del(Y)(q11). Высокая доля интерсексуального (47% пациентов) и женского с признаками дисгенезии гонад (18% пациентов) фенотипа обусловлена высокой долей 45,X клеток. У всех мужчин с делециями с точками разрыва в локусе Yq11.2 отмечают бесплодие, азооспермию или олигозооспермию.

Делеции эухроматина длинного плеча Y-хромосомы часто связана с нарушением сперматогенеза и мужским бесплодием). Было предположено наличие

в длинном плече Y-хромосомы участка, необходимого для сперматогенеза, названного фактор азооспермии (AZF, Azoospermia Factor) [Tiepolo L., Zuffardi O., 1976]. Делеции в локусе AZF могут быть цитогенетически выявляемыми 'макроделециями' и микроделециями, обнаруживаемыми молекулярно-генетическими методами. Важно отметить, что делеции в локусе AZF могут быть обусловлены цитогенетическими видимыми перестройками Y-хромосомы: терминальными или интерстициальными делециями, транслокациями, изодисцентрическими, кольцевыми хромосомами или другими структурными перестройками.

Если при стандартном цитогенетическом исследовании не удается определить происхождение перестроенной хромосомы, ее называют *маркерная хромосома* или *маркером*, который обозначают акронимом 'mar'. Наиболее крупное когортное исследование (512 случаев) маркерных хромосом, выполненных Т. Лиром и соавт. показано, большинство всех малых сверхчисленных маркерных хромосом (sSMC) происходят из хромосомы Y в 72,6% случаев [Liehr T. et al., 2007]. Второй по частоте является дериватная хромосома X, которая составила 27% sSMC. У пациентов с нарушением формирования пола, полового развития/репродуктивной функции встречаются практически только маркеры гоносомного происхождения – дериваты половых хромосом, которые могут быть в регулярной или мозаичной форме, присутствовать в эуплоидном кариотипе или быть сверхчисленными. Установление происхождения этих маркеров и типа хромосомной перестройки, приведшей к их образованию возможно при использовании молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов.

1.4.5. Микроструктурные перестройки половых хромосом.

До разработки и внедрения молекулярных методов исследования микроструктурные перестройки, в том числе с вовлечением половых хромосом их материала практически не могли быть изучены. Появление методов молекулярно-цитогенетических (FISH анализ и его модификаций), а также молекулярно-генетических (ДНК-гибридизация, ПЦР и его модификаций, ПДРФ и других) позволило изучение различных микроструктурных и генных мутаций половых хромосом. В последние годы стремительно развиваются новые методы молекулярно-цитогенетические методы исследования: микроматричный анализ

хромосом или сравнительная геномная гибридизация (CGH, CGH array), анализ числа копий, однако, в целом, они остаются менее изученными, по сравнению с цитогенетически идентифицируемыми («макроперестройками») половых хромосом [Gardner et al., 2013].

Микроструктурные перестройки половых хромосом, также как и цитогенетически идентифицируемые структурные аномалии могут быть сбалансированными и несбалансированными, регулярными или мозаичными. В большей степени изучены несбалансированные перестройки, например, микроделеции и скрытые транслокации половых хромосом, поскольку сбалансированные перестройки труднее детектируются и часто являются полиморфизмами. Микродупликации гомосом диагностируют редко, в большинстве случаев не имеют фенотипических последствий [Gardner et al., 2012].

Микроделеции X-хромосомы часто представляют собой «синдром протяженной делеции», фенотипическая картина которого определяется набором утраченных генов, при этом в отличие от мужчин, женщины-носительницы могут быть здоровы или иметь 'мягкие' фенотипические проявления, но при преимущественной инактивации неперестроенной хромосомы X – могут быть больными [Grillo et al., 2010; Gardner et al., 2013]. Так, для микроделеций в локусе Xp21 возможно различное сочетание мышечной дистрофии Дюшена, пигментного ретинита, гипоплазии надпочечников, дефицита глицерол-киназы, и умственной отсталость [Worley et al., 1995], для микроделеций (а также терминальных делеций) Xp22 – различные нарушения или их сочетания: низкого роста, точечной хондродисплазии, X-сцепленного ихтиоза, гипогонадотропного гипогонадизма с аносмией (синдрома Кальмана) и глазного альбинизм [Meindl et al., 1993].

В последние годы начато исследование перестроек половых хромосом с помощью методов CGH array и CNV, в том числе у пациентов с нарушением репродуктивной системы: мужчин с бесплодием, женщин с синдромом преждевременной недостаточности яичников, а также пациентов с нарушением формирования пола неясного генеза [Quilter et al., 2010; White et al., 2011; Lo Giacco et al., 2014]. Их использование позволяет обнаруживать такие генетические нарушения хромосомы X, как микродупликации Xp21, включающие ген *DAX1*,

микроделеции гена *SOX3* в локусе Xq27, связанные с 46,XY и 46,XX нарушением пола, соответственно [White et al., 2011].

Микроперестройки перестройки хромосомы Y изучены в большей степени, чем хромосомы X. Это обусловлено Y-хромосома представлена в кариотипе в гемизоте, что позволяет легче анализировать ее локусы. Первая карта делеционных интервалов создана Vergnaud и соавт. в 1986 году [Vergnaud et al., 1986]. Впоследствии активное исследование перестроек Y-хромосомы спомощью ПЦР-анализа STS-маркко микроделеционных интервалов [Vollrath D. et al., 1992] и создания карты локуса AZF [Vogt et al., 1996] (рис. 3 Приложения). Детальная карта Y-хромосомы была построена после секвенирования ее MSY региона группой под руководством проф. Дэвида Пейджа [Skaletsky et al., 2003] (рис. 4 приложения).

Структурные аномалии Y-хромосомы характеризуются рядом особенностей, во-первых, высокой частотой, особенно микроделеций и парацентрических инверсий, во-вторых разнообразием их типов и различным фенотипическим влиянием на развитие и функцию репродуктивной системы, сперматогенез и рост.

Микроперестройки короткого плеча Y-хромосомы изучены в меньшей степени, чем перестройки ее длинного плеча. Наиболее частыми из них являются микроделеции региона PAR1, захватывающие ген *SHOX*, а также делеционный полиморфизм короткого плеча Y-хромосомы. Делеции составляют около половины всех мутаций гена *SHOX*, встречающихся с частотой примерно 1 на 1700 индивидуумов. Делеции региона PAR1 у мужчин ведут к бесплодию из-за блока сперматогенеза, вызванного нарушением конъюгации половых хромосом. У мужчин с перестройками PAR1 региона отмечена увеличенная доля сперматозоидов с анеуплоидией по гоносомам (XY), что ведет к повышенному риску рождения мальчиков с синдромом Клайнфельтера.

Исследование наличия в геномной ДНК локуса *AMELY* широко используется при определении пола. У некоторых мужчин с кариотипом 46,XY обнаруживают его отсутствие вследствие микроделеции локуса Yp11.2. Как было показано, в большинстве случаев область делеции имеет размер 3.0-3.8 млн.п.н. и захватывает гены *AMELY*, *PRKY*, *TBLIY* и часть мультикопийных генов *TSPY*. Картирование точек разрыва, а также анализ числа копий *TSPY* свидетельствовали, что данные

микроструктурные перестройки возникают в результате неаллель-гомологичной рекомбинации между проксимальным кластером генов *TSPY* и его дистальной копией. Данные Yp микроделеции встречаются в различных популяциях, зачастую являясь полиморфизмом, фенотипическое влияние которого пока не установлено. Частичная дупликация локуса Yp11.2 описана у мужчин, также не имевших каких-либо фенотипических особенностей [Murphy et al., 2007].

Наиболее изученными микроструктурными аномалиями Y-хромосомы являются микроделеции длинного плеча. Они встречаются с частотой примерно 1 на 1000-1500 мужчин, занимая второе место (после синдрома Клайнфельтера) среди генетических причин бесплодия, связанного с тяжелым нарушением сперматогенеза [Vogt et al., 1996; Foresta et al., 2004; Simoni et al., 2004; Vogt, 2005; Ferlin et al., 2007]. Их обнаруживают в среднем у 10-12% мужчин с азооспермией и у 8-9% мужчин с олигозооспермией тяжелой степени. В большинстве случаев не являющиеся полиморфизмами AZF делеции приводят к выраженному угнетению сперматогенеза вплоть до синдрома “только клетки Сертоли” [Reijo et al., 1995; Vogt et al., 1996; Ferlin et al., 1999; 2007; Гоголевский и др., 2001].

Делеции в локусе AZF могут быть ‘полными’, т.е. целиком удаляющими фрагмент, охватывающий один или более AZF (суб)регион и ‘частичными’, если делеции не полностью захватывают какой-либо AZF регионов (рис. 16). Практически во всех случаях полные AZF делеции являются мутациями *de novo* и приводят к секреторной азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени [Vogt et al., 1996; Foresta et al., 2001; Vogt, 2005; Ferlin et al., 2007]. В редких случаях описаны случаи наследования микроделеций Y-хромосомы при оплодотворении естественным путем [Chang et al., 1999; Page et al., 1999; Krausz et al., 2006; Oates et al., 2002] и после проведения экстракорпорального оплодотворения методом ICSI [Oates et al., 2002]. Наиболее частым типом полных (‘классических’) AZF делеций являются полные AZFc (b2/b4) делеции, доля которых составляет 65-70% [Vogt et al., 1996]. Второе место по частоте встречаемости (15-20%) занимают делеции, захватывающие регионы AZFc и/или AZFb (AZFb+c и AZFb делеции). Наиболее редко (5-10%) выявляют делеции AZFa региона или делеции AZFa+b и AZFa+b+c [Ferlin et al., 2007].

Для полных AZF делеций прослеживается довольно четкая зависимость степени нарушения сперматогенеза от типа делеций, что может иметь прогностическое значение в плане возможности получения сперматозоидов, пригодных для проведения программ экстракорпорального оплодотворения. Наличие полных AZFa, AZFb+c, AZFa+b+c делеций характеризуется тяжелой степенью угнетения сперматогенеза (часто вплоть до «Сертоликлеточного» синдрома или синдрома 'только клетки Сертоли'), при этом практически не удается получить сперматозоиды пригодные для искусственного оплодотворения, в том числе с помощью различных методов биопсии яичка и придатка яичка [Hopps et al., 2003]. У мужчин с полными AZFc (b2/b4) делециями в 50-70% случаев возможно получить сперматозоиды, пригодные для ICSI [Oates et al., 2002; Hopps et al., 2003]. Спермиологический диагноз и гистологическая картина у мужчин с полными делециями AZFc (b2/b4) варьируют от азооспермии до олигозооспермии, и от «Сертоликлеточного» синдрома до гипосперматогенеза, соответственно [Reijo et al., 1995; Vogt et al., 1996; Гоголевский и др., 2001; Foresta et al., 2001].

AZFc регион 'референсной' Y-хромосомы человека (рис. 20) содержит 32 транскрибируемых последовательности [Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Skaletsky et al., 2003] (табл. 7 Приложения). Амликаны, располагающиеся в регионе AZFb и, особенно в регионе AZFc, выражено варьируют по составу и композиции составляющих их протяженных повторов, поэтому ПЦР анализ STS-маркеров Y-хромосомы не всегда позволяет точно определить тип ее перестройки. Полные AZFc (b2/b4) делеции имеют размер 3,5 млн. пар нуклеотидов и приводят к потере 21 гена, частичные – могут иметь различный размер (от нескольких тыс. пар нуклеотидов до 2 м.п.н.) и положение, удаляя от одного до трети и более генов AZFc региона [Repping et al., 2003; 2004; 2006]. К настоящему времени описано несколько различных типов частичных AZFc делеций (gr/gr, b1/b3, b2/b3, b3/b4 и др.), а также их подтипов [Vogt, 2005; Repping et al., 2006]. Определение подтипа делеции и числа утраченных/оставшихся генов данного региона возможна с помощью анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNV вариантов) для количественной оценки копий генов (*DAZ*, *CDY* и др.) данного региона [Machev et al., 2004].

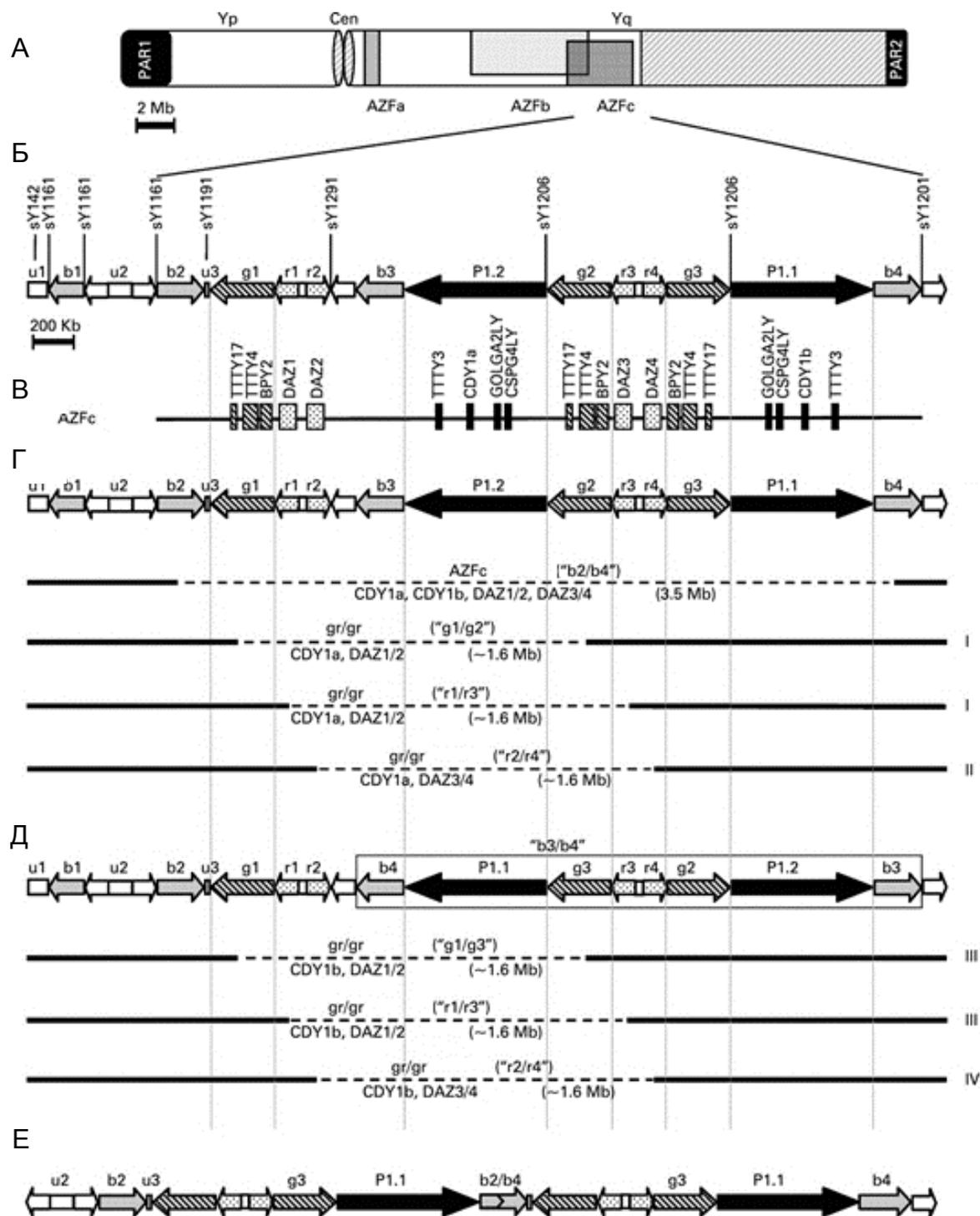


Рис. 20. Схематичное изображение Y-хромосомы человека с указанием ее псевдоаутосомных (PAR1, PAR2) и AZF (AZFa, AZFb, AZFc) регионов (А).

Примечание: На выноске детально показан регион AZFc, структура палиндромов региона и картирующих их границы STS-маркеров (Б). Ниже приведены положение генов (В), структура палиндромов в норме (Г) и при инверсиях в пределах AZFc региона (Д, Е) а также границы различных типов делеций AZFc: полной (b2/b4) и частичных (gr/gr), с указанием размеров и делетированных генов.

Исследование гаплотипа у мужчин с микроделециями Y-хромосомы позволили обнаружить межэтнические различия в частотах некоторых микроделений, а также установить, что частота встречаемости определенных частичных AZFc делеций (gr/gr, b2/b3) зависит от гаплотипа Y-хромосомы [Repping et al., 2004; 2006; Vogt, 2005; Wu et al., 2007; Giachini et al., 2008; Krausz et al., 2008]. Так, делеция b2/b3 характерна для гаплогруппы N [Repping et al., 2004].

Некоторые гаплогруппы Y-хромосомы, в например, C, DE* и O3e, могут предрасполагать к образованию делеций gr/gr, тогда как другие, например, гаплогруппы O3* и O1* характеризуются низкой вероятностью их возникновения [Arredi et al., 2007; Yang et al., 2008]. Несмотря на многочисленные исследования не удалось выявить определенной зависимости состояния сперматогенеза от наличия и типа частичной AZFc делеций, поскольку оно значительно варьирует, от нормы до азооспермии [Machev et al., 2004; Ferlin et al., 2005; Hucklenbroich et al., 2005].

По данным исследований различных выборок мужчин (по этническому составу и состоянию фертильности, показателям концентрации сперматозоидов) частота неполных делеций AZFc региона (в частности, gr/gr, b2/b3 и b1/b3) варьирует от 1% до 20% [Repping et al., 2006; Wu et al., 2007; Giachini et al., 2008]. Для некоторых типов частичных делеций региона AZFc выявлена их повышенная частота среди мужчин с азооспермией и олигозооспермией по сравнению с фертильными мужчинами, мужчинами с нормозооспермией, однако в ряде исследований не установлено статистически достоверного различия между этими группами [Machev et al., 2004; Ferlin et al., 2005; Vogt, 2005]. Особо следует отметить тот факт, что в группе мужчин с gr/gr делецией выявлена более высокая по сравнению с популяционной частота встречаемости рака яичка [Nathanson et al., 2005].

В отличие от полных AZF делеций, частичные делеции, в частности AZFc региона, характеризуются различной степенью влияния на сперматогенез и фертильность, от азооспермии до нормозооспермии [Fernandes et al., 2002; 2004; Machev et al., 2004]. Являясь зачастую микроструктурными полиморфизмами Y-хромосомы, они в большинстве случаев могут наследоваться по мужской линии, однако их наличие может быть фактором, предрасполагающим к снижению фертильности [Repping et al., 2006]. Однако патогенетическая и клиническая

значимость частичных делеций и других изменений AZFc региона на репродуктивную функцию мужчин остается недостаточно изученной.

В последние годы ряд исследований свидетельствуют о связи микроделеций Y-хромосомы с мозаицизмом X/X_Y [Siffroi et al., 2000]. Показано, около трети X/X_Y мозаиков являются носителями микроделеций в локусе AZF. Кроме того часть мужчин, имеющих Yq микроделеции является скрытыми мозаиками по клону 45,X. Эти данные свидетельствуют о том, что нестабильность Y-хромосомы может быть вызвана не только цитогенетически видимыми перестройками Y-хромосомы, но и микроделециями. По-видимому, часть случаев дисгенезии гонад может быть обусловлена данным механизмом возникновения гонадного мозаицизма.

1.5. Клинические аспекты нарушений развития и/или функции репродуктивной системы, связанных аномалиями с вовлечением половых хромосом.

Выше был приведен обзор морфогенеза и генетического контроля дифференцировки и развития мужской и женской половой системы у человека, половых хромосом и типы их количественных и структурных перестроек. Ниже будут рассмотрены клинические варианты, вызванные различными аномалиями половых хромосом, связанных с нарушением развития репродуктивной системы, а также делеций длинного плеча Y-хромосомы у мужчин с бесплодием.

Сложность дифференцировки пола и развития органов половой системы является предпосылкой многообразия нарушений формирования пола (НФП). Различные аномалии пола могут быть как фенотипически различными, так и схожими, при этом для многих форм НФП характерна выраженный клинический полиморфизм и/или генетическая гетерогенность. Вследствие этого классифицирование нарушений полового развития является сложной, а их дифференциальная диагностика зачастую представляют собой непростую задачу. Многими авторами были предложены различные классификации нарушений формирования пола/полового развития. В настоящее время общепринята классификация нарушений формирования пола (Disorders of Sexual Development, DSD), определяемых как 'врожденные состояния, обусловленные хромосомным, гонадным или соматическим нарушением формирования пола'), предложенная Консенсусом 2006 г. по аномалиям полового развития [Lee et al., 2006]. Согласно

нее все аномалии формирования пола подразделены на 3 группы: 1) гоносомно-обусловленные НФП (НФП вследствие аномалий половых хромосом), 2) 46,XY НФП, 3) 46,XX НФП.

Нарушения развития органов половой системы представляют большую группу заболеваний с высокой клинической вариабельностью и генетической гетерогенностью. Генетически обусловленные нарушения формирования пола (НФП) могут быть обусловлены как хромосомными мутациями (анеуплоидиями, химеризмом XX/XY, гоносомным мозаицизмом, структурными аномалиями гоносом), так и генными мутациями. Большую часть хромосомных аномалии у пациентов с нарушением развития половой системы составляют мутации половых хромосом [Курило и др., 2000]. Среди численных гоносомных аномалий наиболее частыми гоносомными синдромами являются: синдром Шерешевского-Тернера, классический вариант - моносомия X (45,X), синдром Клайнфельтера (47,XXY), дисомия Y (47,XYY) и трисомия X (47,XXX) [Schinzel, 2002; Gardner et al., 2012].

1.5.1. Синдром Клайнфельтера и его варианты.

Синдром Клайнфельтера (СК) является одним из наиболее частых хромосомных заболеваний и самым частым изменением числа половых хромосом у человека [Давиденкова и др., 1973; Gardner, Sutherland, 2004; Gardner et al., 2012; Козлова, Демикова, 2007]. Частота его встречаемости составляет 1 на 500-600 лиц мужского пола. Впервые СК был описан в 1942 году, т.е. еще до установления хромосомной этиологии [Klinefelter et al., 1942]. СК является самой частой генетической причиной тестикулярной дисгенезии, ведущей к гипогонадизму и бесплодию у мужчин. У большинства (80-85%) пациентов с СК обнаруживают его классический цитогенетический вариант – кариотип 47,XXY. В остальных случаях выявляют другие цитогенетические варианты СК в регулярной или мозаичной форме. К редким цитогенетическим вариантам относят структурные перестройки хромосомы X или Y, например с наличием в каротипе изохромосомы X – 47,XY,i(X)(q10) или изодичесентрической хромосомы Y – 47,XX,idic(Y)(11.2) [Stemkens et al., 2007; Frühmesser, Kotzot, 2011; Sabbaghian et al., 2011].

К минимальным диагностическим признакам СК относят кариотип 47,XXY, гипергонадотропный гипогонадизм, гипогенитализм (гипоплазия яичек и полового члена).

Больные СК имеют высокий рост с непропорционально длинными конечностями. У пациентов с кариотипом 47,XY,i(X)(q10) не отмечают высокого роста, что очевидно связано с наличием нормального количества копий гена *SHOX* (n=2). У 15-20% больных СК отмечают снижение интеллекта IQ менее 80 [Козлова и др., 2007]. Брахицефалия, низкий рост волос на затылке, невыраженные деформации ушных раковин, клинодактилия V, поперечная ладонная складка, радиоульнарный синостоз, сколиоз, неврологические нарушения – судороги, атаксия, тремор. Вследствие дефицита андрогенов может наблюдаться снижение либидо, импотенция. Половое оволосение по женскому типу, гинекомастия в 50% случаев [Козлова и др., 2007]. Из пациентов с другими цитогенетическими вариантами обнаруживаемыми при СК – кариотип 48,XXXУ; 48,XXУУ, гоносомный мозаицизм, с наличием нормальных (эуплоидных) и анеуплоидных по гоносомам клон(ов) с наличием дополнительной(ых) хромосом X, часто – мозаицизм 46,XY/47,XXУ, редко встречается наличие дицентрической хромосомы X, мозаицизм 46,XX/47,XXУ или сложный гоносомный мозаицизм с присутствием клон(ов) с двумя и более хромосомами X, что может влиять на выраженность клинических проявлений [Al-Awadi et al., 1979; Zamora et al., 2002]. Так, у некоторых из таких мозаиков, имеющих дополнительных хромосом(ы) X может иметь место более тяжелые нарушения дифференцировки гонад, например овотестикулярная форма НФП [Wit et al., 1987].

С увеличением количества дополнительных гоносом утяжеляются и другие фенотипические нарушения. Так для пациентов с СК, в кариотипе которых присутствует 3 или 4 хромосомы X и/или встречается полисомия (тетрасомия или пентасомия) по гоносомам, особенно в регулярной форме, характерны пороки развития и умственная отсталость, у всех бесплодие. Подобные хромосомные мутации не строго различаются друг от друга вследствие их выраженной фенотипической перекрываемости между собой, и большинством исследователей относятся к редким вариантам СК. Однако некоторые авторы предлагают отдельно некоторые состояния как отдельные патологические формы, например синдром 48,XXУУ.

Синдром Клайнфельтера одна из наиболее частых генетических причин бесплодия у мужчин. У большинства пациентов с СК выявляют выраженные

нарушения сперматогенеза (азооспермию или олигозооспермию тяжелой степени) и только в редких случаях, как правило мозаичных, – умеренную олигозооспермию, а при гистологическом исследовании гонад обнаруживают гиалиноз, фиброз семенных канальцев, вторичную гиперплазию клеток Лейдига. FISH анализ сперматозоидов при СК свидетельствует о повышении доли анеуплоидных половых клеток, в первую очередь с нерасхождением половых хромосом.

1.5.2. Синдром 47,XYY-мужчина (дисомия Y).

Дисомия по Y-хромосоме является одним из наиболее частых хромосомных и гоносомных аномалий у человека, занимая третье место после синдрома Дауна и синдрома Клайнфельтера. Частота ее встречаемости составляет примерно 1 на 1000 мужчин [Gardner, Sutherland, 2004; Козлова, Демикова, 2007]. Значительно реже встречаются трисомия, и исключительно редко тетрасомия по хромосоме Y, которые могут как в регулярной, так и мозаичных формах и имеют более выраженные фенотипические проявления в виде аномалий развития (аномалии скелета, зубов, крипторхизм, гипогонадизм, паховые грыжи, аномалии крупных сосудов – стеноз легочной артерии и другие пороки развития) и умственной отсталости [Козлова, Демикова, 2007]. С увеличением количества дополнительных гоносом утяжеляются фенотипические проявления [Ворсанова и др., 1999]. Кроме этого наличие двух хромосом Y в кариотипе может наблюдаться при таких вариантах полисомии по гоносомам, как 48,XXYY и 49,XXXYY, первый из которых фенотипически очень схож с синдромом Клайнфельтера, и рядом авторов расценивается как его цитогенетический вариант [Muldal, Ockley, 1960].

Кариотип 47,XYY в большинстве случаев встречается у мужчин и исключительно редко у женщин в качестве редкого цитогенетического варианта XY-дисгенезии гонад (теоретически возможно и совпадение тесикулярной феминизации и Y-Y нерасхождения). Из всех полисомий у мужчин дисомия по хромосоме Y имеет наиболее мягкое фенотипическое проявление. Средний рост больных при этом немного превышает норму. Кроме этого среди необязательных признаков дисомии Y отмечают нарушение поведения (склонность к агрессивным реакциям, асоциальным поступкам, импульсивность, психопатические черты характера), нетяжелую умственную отсталость, нарушения физического развития и полового развития, крипторхизм, гипогонадизм [Давиденкова и др., 1973;

Ворсанова и др., 2006; Козлова, Демикова, 2007]. У некоторых пациентов отмечают шизофрению, депрессивные психозы, тяжелые формы психопатий и эпилепсию. Однако у большинства мужчин с кариотипом 47,XY^Y не наблюдают каких-либо нарушений физического и умственного развития, а их репродуктивная функция, как правило, не нарушена. При сохраненном сперматогенезе отмечают повышенную частоту дисомии по гоносомам в сперматозоидах (XY и YY), что может повышать риск синдрома Клайнфельтера и дисомии по Y-хромосоме у потомства. Однако достоверных клинических подтверждений повышения частоты трисомии по половым хромосомам (XY^Y или XXY) у потомства мужчин с кариотипом 47,XY^Y не зафиксировано. У некоторых 47,XY^Y мужчин отмечают бесплодие и нарушение сперматогенеза, вплоть до азооспермии, причина которых в большинстве случаев дисомии Y остается не установленной.

1.5.3. Трисомия X

Синдром трипло X или трисомия по хромосоме X является одним из наиболее частых гоносомных синдром и всех анеуплоидий у человека, совместимых с жизнеспособностью. В большинстве случаев кариотип 47,XXX обнаруживают у женщин, и только в исключительно редких у мужчин (уникальные случаи SRY+XX-инверсии пола в сочетании с нерасхождением хромосом X). Репродуктивная функция у женщин с трисомией X, особенно при мозаичном ее варианте (46,XX/47,XXX) часто сохранена, но может наблюдаться повышенная частота невынашивания беременности. Теоретически можно было бы ожидать, что при прохождении мейоза XXX ооциты дадут тип сегрегации 2:1, с продукцией равных долей зрелых X и XX ооцитов. Однако на практике этого не происходит и большинство анеуплоидных по хромосоме X женских половых клеток гибнет. Только один случай рождения 47,XXX дочери у матери с синдромом трипло X был описан в литературе [Otter et al. 2010]. По видимому, большинство созревших ооцитов у женщин с трисомией X имеют кариотип 22,X, а значительная часть анеуплоидных по гоносомам ПК гибнет в ходе мейоза [Neri, 1984]. Несколько случаев преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ) у женщин с трисомией X были описаны в литературе, однако их сочетание встречается редко, и механизм негативной селекции анеуплоидных по хромосоме X половых клеток остается недостаточно изученным [Holland, 2001].

1.5.4. Синдром Шерешевского-Тернера

Синдром Шерешевского-Тернера (СШТ) является одним из наиболее частых гоносомных нарушений у лиц женского пола. Его популяционная частота составляет примерно 1 на 5000 или 1 на 2500 лиц женского пола. СШТ характеризуется полной (кариотип 45,X или моносомия по хромосоме X) или частичной потерей материала хромосомы X, наблюдаемой в регулярной или мозаичной форме.

При стандартном цитогенетическом исследовании (анализе кариотипа на лимфоцитах периферической крови) классическую форму СШТ (моносомию X) выявляют у 40-50% пациенток [Давиденкова и др., 1973; Тарская, 1996; Бочков, 1997; 2002; Вяткина, 2003; Gardner et al., 2012]. В остальных случаях встречаются мозаичные варианты с анеуплоидией по гоносомам. Кроме того, у трети всех пациенток с СШТ проведение молекулярно-генетического и/или молекулярно-цитогенетического исследования позволяет выявить скрытый мозаицизм по гоносомам с наличием клона 45,X. В среднем у 10-15% больных с СШТ обнаруживают Y-хромосому или наличие ее материала в виде явного или скрытого мозаицизма, что может быть причиной возникновения злокачественных опухолей гонад [Осипова, 1997; Вяткина, 2003].

К *минимальным диагностическим признакам* СШТ относят: отёки кистей и стоп, также гипотонию у новорожденных девочек, кожные складки на шее, низкий рост, врожденные пороки сердца, первичную аменорею, полную или частичную моносомию по хромосоме X. Типичными признаками СШТ являются: низкий рост (98%), крыловидные кожные складки на шее (56%), широкая грудная клетка (60%), X-образное искривление голеней (56%), половой инфантилизм (94%), первичная аменорея (96%), бесплодие (99%). Средний рост взрослых больных составляет – 140 см. У новорожденных в 40% случаев отмечают периферический лимфатический отек кистей и стоп. У пациентов с СШТ – короткая шея, эпикант, низкая линия роста волос на затылке, гипоплазия и гипертрофия ногтевых пластинок, короткие метакарпальные (особенно IV) или метатарзальные кости, гиперпигментация кожи, высокое небо, снижение зрения и слуха, микрогнатия, воронкообразная грудная клетка, аномалии мочевой системы, пороки сердечно-сосудистой системы (наиболее часто – коарктация аорты и дефект

межжелудочковой перегородки), артериальная гипертензия, может быть снижение интеллекта.

Клиническая картина у пациентов с X/XY мозаицизмом характеризуется широким фенотипическим спектром от СШТ без или с признаками вирилизации, двойственного развития гениталий, до мужского фенотипа без или с признаками дефицита маскулинизации. Клинические проявления СШТ варьируют, и в определенной мере зависят от его цитогенетического варианта. Как правило, тяжесть фенотипических нарушений напрямую коррелирует с выраженностью анеуплоидии (соотношением клеточных клонов в различных тканях) и/или размером потерянного материала X-хромосомы.

Охарактеризованы X- и Y-сцепленные гены, нарушение функции которых ответственно за развитие фенотипических нарушений при СШТ: низкий рост и нарушение формирования скелета [Ellison et al., 1997; Rao et al., 1997; Ogata et al., 2001], лимфатической системы [Boucher et al., 2001], репродукции [Ogata et al., 1995; Zinn et al., 1998]. Активно изучают роль эпигенетических факторов при СШТ: характер инактивации X-хромосомы при структурных перестройках X-хромосомы и/или мозаицизме. Однако гено-фенотипические корреляции при СШТ, в частности при мозаицизме по гоносомам (X/XY и др.), остаются недостаточно изученными.

Причиной возникновения СШТ является пре- или постзиготическая потеря хромосомы X или Y, что может быть связано с макро- или микроструктурными структурными перестройками половых хромосом. Установлено, что в большинстве случаев моносомии X (70-90%) присутствующая хромосома имеет материнское происхождение [Hassold et al., 1990; Jacobs et al., 1997; Вяткина и др. 2003]. Преимущественная потеря отцовской гоносомы может быть обусловлена нерасхождением половых хромосом в сперматогенезе. Косвенным подтверждением данного механизма моносомии X служит повышенная частота анеуплоидии и нулесомии по гоносомам в сперматозоидах у отцов пацентов с кариотипом 45,X [Martinez-Pasarell et al., 1999].

1.5.5. Мозаицизм X/XY и его варианты

Мозаицизм X/XY характеризуется значительной фенотипической вариабельностью полового развития в зависимости от представленности Y-несущих

клона(ов): от синдрома Шерешевского, различных вариантов ложного и истинного гермафродитизма, гипогонадизма и/или бесплодия у мужчин [Hsu, 1994]. Частота встречаемости X/X_Y мозаицизма составляет примерно 1 на 15 тыс. новорожденных. Примечательно, что пре- и постнатальный периоды развития характеризуются различием в частоте фенотипов (мужского и женского). Причиной данного вида гоносомного мозаицизма является постзиготическая потеря Y-хромосомы в части клеток эмбриона. Это может быть вследствие нерасхождения половых хромосом, нарушением конъюгации, отставанием Y-хромосомы в анафазе и ее последующей деградацией в части клеток. Факторами, предрасполагающими к возникновению мозаицизма X/X_Y, являются макро- и микроструктурные перестройки Y-хромосомы. Так в большинстве случаев дицентрических, кольцевых и изохромосом Y отмечают явный мозаицизм с наличием клона 45,X, отмечают уже при стандартном цитогенетическом исследовании. Кроме того, проведение молекулярного и/или молекулярно-цитогенетического исследования позволяет обнаружить наличие гоносомного мозаицизма практически у всех пациентов, имеющих данные хромосомные аномалии, а также у части индивидуумов, имеющих терминальные и интерстициальные делеции Y-хромосомы. Наличие структурной перестройки Y-хромосомы, не являющейся ее полиморфизмом, в большинстве случаев ведет к нарушению формирования пола и/или репродуктивной функции, поэтому, как правило, не передается потомству. Однако редкие случаи их наследования, в том числе в виде мозаицизма X/X_Y были описаны в литературе. С другой стороны обнаружена высокая доля нулесомных по гоносомам сперматозоидов у мужчин с делециями длинного плеча Y-хромосомы, у которых сохранен сперматогенез.

Мозаицизм по Y-хромосоме является одной из причиной как тяжелых, так и 'мягких' форм нарушения дифференцировки пола по мужскому типу, ведущему к недостаточности маскулинизации – синдром тестикулярной дисгенезии, STD [Röpke et al., 2007; Beaulieu Bergeron et al., 2011; Farrugia et al., 2013]. Спектр фенотипических проявлений зависит от степени дефицита маскулинизации и может включать только нарушение сперматогенеза и бесплодие у мужчин, наличие гипоплазии яичек, гипогонадизма, крипторхизма, микрофаллии и/или гипоспадии. *Гипоспадия* – аномалия полового развития по мужскому типу, характеризующаяся

расположением отверстия мочеиспускательного канала на вентральной (задней) стороне полового члена (см. рис. стадии маскулинизации по Прадеру). Частота ее встречаемости составляет 1 на 250-300 (~0,4%) новорожденных мужского пола [Козлова С.И., Демикова Н.С., 2007]. 'Изолированная' гипоспадия (ОММ 146450). По степени нарушения развития выделяют 5 форм гипоспадии: "гипоспадию без гипоспадии" (наиболее легкая форма гипоспадии), головчатую или венечную, стволовую, мошоночную, промежностную (наиболее тяжелая форма). Для гипоспадии характерно искривление полового члена и смещение наружного отверстия уретры (за исключением первой формы). При промежностной и мошоночной формах наблюдают расщепление мошонки, крипторхизм, широкий вход в уретру, напоминающий вход во влагалище (мочеполовой или урогенитальный синус, УГС). Гипоспадия гетерогенная по происхождению аномалия формирования пола, которая может быть вызвана хромосомными, или генными мутациями или мультифакториальной. В 8-10% случаев она сочетается с овотестикулярной формой НФП. Однако гипоспадия может быть изолированной или в составе симптомов при различных генных и хромосомных синдромах.

Асимметричная дифференцировка и развитие гонад без наличия тестикулярной и овариальной ткани у одного индивидуума могут быть обусловлены различной степенью нарушения их дифференцировки и развития или односторонним их поражением. В данных случаях возникает *смешанная дисгенезия гонад (СДГ)*, как правило, характеризующаяся наличием тестикула (яичка) с одной стороны и дисгенетичной тяжелой (стрек) гонады с другой стороны [Sahval, 1963; Brosman, 1979]. В зависимости от выраженности СДГ развитие половой системы варьирует от мужского с признаками дефицита маскулинизации (крипторхизм, гипоспадия, гипогонадизм, нарушение сперматогенеза, бесплодие у мужчин) до двойственного развития. Причинами СДГ могут быть мозаицизм по Y-хромосоме, например, X/X^Y, в том числе скрытый, наличие структурной перестройки Y, делеции или точковой мутации гена *SRY*. В случае мозаицизма 45,X/46,X^Y или его вариантов пациенты с СДГ могут иметь клинические проявления синдрома Шерешевского-Тернера в зависимости от выраженности клона 45,X и/или дозы генов гоносом, ответственных за признаки СШТ.

1.5.6. XX-инверсия пола (46,XX тестикулярная форма НПФ)

В некоторых случаях нарушение формирования пола фенотип, развитие половой системы не соответствует кариотипу, при этом у пациента обнаруживают набор половых хромосом характерный для другого пола. Такая аномалия называется инверсия пола. В зависимости от наличия Y-хромосомы в кариотипе выделяют два ее типа: XX-инверсия и XY-инверсия пола. Наличие женского фенотипа при нормальном мужском кариотипе характеризует XY-инверсию пола, которая имеет место при чистой форме XY-дисгенезии гонад. Некоторыми исследователями к XY-инверсии пола относят и другие формы 46,XY НПФ, например полную форму синдрома тестикулярной феминизации, СТФ, однако это неправильно в связи с тем, что при данных аномалиях имеет место частичная двойственность развития органов половой системы. XX-инверсия пола или синдром XX-мужчина (синдром Де ля Шаппеля, de la Chappelle) – в настоящее время называют XX-тестикулярная форма нарушения формирования пола [Lee et al., 2007]. Встречаемость синдрома 46,XX-мужчина составляет 1 на 20 тыс. мужчин.

XX-тестикулярная форма НПФ в 85-90% случаев обусловлена наличием в геноме гена *SRY*. Поэтому для полного развития мужского фенотипа может быть достаточно наличия в геноме гена *SRY*, а не целой Y-хромосомы. В большинстве случаев это связано с наличием микроструктурной перестройки – скрытой транслокации фрагмента Yp11 с локусом *SRY* на хромосому X, реже – на аутосому, либо скрытым гоносомным мозаицизмом. При этом вследствие отсутствия генов локуса *AZF*, контролирующих дифференцировку мужских половых клеток, а также наличие двойной дозы X-сцепленных генов, не подверженных инактивации приводит у всех XX-мужчин к практически полному отсутствию сперматогенного эпителия в извитых семенных канальцах, и как следствие к азооспермии и бесплодию.

Для большинства пациентов с 46,XX тестикулярной формой НПФ не характерна двойственность строения гениталий, но у некоторых отмечают фенотипические проявления недостаточности андрогенов: крипторхизм, гипоспадия, гинекомастия гипогонадизм и недостаточная выраженность мужских вторичных половых признаков. При этом не отмечено явной корреляции с размером имеющегося в кариотипе фрагмента Y-хромосомы. Хотя степень маскулинизации

SRY-отрицательных XX-мужчин пациентов в целом ниже SRY-положительных, среди первых описаны и случаи с полной маскулинизацией [Vilain et al., 1994; Zenteno et al., 1997; Valetto et al., 2005; Rajender et al., 2006].

SRY-негативная XX-инверсия пола является генетически гетерогенной и может быть вызвана, как микроструктурными перестройками аутосом и хромосомы X, в частности дупликациями локусов, содержащих гены-гомологи гену *SRY* (*SOX3* и *SOX9*), так и точковыми мутациями генов, контролирующих дифференцировку гонад - *FOXL*. Так дупликация регуляторной области или самого гена *SOX9*, локализованного на длинном плече хромосомы 17 в локусе q24.3, вызывает развитие SRY-негативной XX-инверсии пола: полной – синдром XX-мужчина или неполной – 46,XX овотестикулярная форма НФП (ИГ). При этом в большинстве дупликаций 17q24.3 не происходит формирования нормальных тестикул, что ведет к овотестикулярной форме нарушения формирования пола. Белок SOX9 является транскрипционным фактором, играющим важную роль в процессе эмбриогенеза при развитии скелета и репродуктивной системы. Мутации в гене *SOX9* приводят к развитию кампомелической дисплазии (OMIM 114290) – заболеванию, которое влияет на развитие скелета и репродуктивной системы и часто является угрожающим жизни состоянием в период новорожденности. Проявляется синдром искривлением и укорочением костей нижних конечностей, карликовостью, сколиозом, гипоплазией лопаток, вывихами тазобедренных суставов и др. Мутации *SOX9* приводят либо к отсутствию белка, либо к его функциональной дефективности. Около 5% случаев заболевания связаны с хромосомными аномалиями, затрагивающие локус 17q24, в котором лежит этот ген, так как здесь находятся энахансерные последовательности, которые регулируют активность гена *SOX9*. Мутации в самом гене приводят к более тяжелым формам течения заболевания. У пациентов с кариотипом 46,XX и точковыми мутациями в гене *SOX9* имеют дисгенезию гонад без инверсии пола (фенотипически женщины), а у пациентов с кариотипом 46,XY дисгенезия гонад приводит к XY-инверсии пола или двойственному развитию половых органов.

1.5.7. Овотестикулярная форма НФП (истинный гермафродитизм)

Истинный гермафродитизм (ИГ) или согласно современной номенклатуре аномалий полового развития - овотестикулярная форма нарушения формирования

пола (MIM: 235600) является генетически гетерогенным нарушением половой дифференцировки, характеризующимся двойственным развитием гонад (с наличием зрелой тестикулярной ткани – извитых семенных канальцев и зрелой овариальной ткани с присутствием фолликулов) в одной или разных гонадах.

Клиническая характеристика овотестикулярной формы НФП: основные проявления – двойственность строения гениталий (наружных половых органов, чаще по мужскому типу с признаками недостаточности андрогенов (гипоспадией и расщеплением мошонки) и смешанный характер вторичных половых признаков. Мужской фенотип имеют 60% больных, женский – 40%, при этом отсутствует корреляция с наличием Y-хромосомы в кариотипе пациентов.

При овотестикулярной форме НФП двойственное строение гонад может быть с одной стороны (с одной стороны овотестис, с другой яичко или яичник), двусторонним (овотестис с обеих сторон) или альтернативным (с одной стороны гонада представлена яичком, с другой – яичником). Последний вариант встречаются наиболее редко. Яичник или овотестис обнаруживают в брюшной полости или паховом канале, яичко в мошонке или паховом канале. Чем больше составляет доля тестикулярной ткани в овотестис, тем больше вероятность его опущение в мошонку.

Овотестикулярная форма НФП является генетически гетерогенным нарушением причиной которого может быть аномалии в системе половых хромосом, такие как химеризм и мозаицизм по половым хромосомам. У большинства (около 60%) пациентов с ИГ выявляют кариотип 46,XX, в трети случаев обнаруживают различные варианты мозаицизма с присутствием клона, несущего Y-хромосому или ее последовательности, как правило 46,XX/46,XY, а 7% больных имеют кариотип 46,XY [Raygorodskaya et al., 2011]. Таким образом, 10-15% пациентов с ИГ имеют в кариотипе Y-хромосому или ее фрагменты.

SRY+ (Y+) овотестикулярная форма НФП может быть обусловлена мозаицизмом по хромосоме Y, химеризмом 46,XX/46,XY, структурными перестройками гоносом с вовлечением локуса Yp11, в редких случаях – с делециями или мутациями гена *SRY*. Наличие скрытой транслокации фрагмента короткого плеча Y-хромосомы, несущего ген *SRY*, обнаруживают в среднем у 10% пациентов с ИГ и кариотипами 46,XX и 45,X/46,XX. Формирование тестикулярной

ткани у субъектов с овотестис и кариотипом 46,XX может быть вызвано наличием скрытого мозаицизма и/или гена *SRY*, транслоцированного на X-хромосому или аутосому, мутации X-сцепленных или аутосомных генов, либо дупликации генов *SOX9* и *SOX3*. Увеличение дозы данных генов приводит к полному или частичной дифференцировке гонад по мужскому типу или двойственной дифференцировке гонад, развитию тестикулярной ткани и формированию яичек или овотестис у пациентов в отсутствие гена *SRY* и других генов Y-хромосомы.

1.5.8. XX-дисгенезия гонад

Дисгенезия гонад при кариотипе 46,XX или XX-дисгенезия гонад (OMIM 233300). XX-дисгенезия гонад представляет собой генетически гетерогенное нарушение репродуктивной системы и пока частой ее причины не обнаружено. Среди генетических нарушений описаны структурные перестройки X-хромосомы, скрытый гоносомный мозаицизм, например, 45,X/46,XX, а также мутации некоторых генов, вовлеченных в дифференцировку пола и развития половой системы (*SF1*, *FSHR*), а также некоторых других аутосомных и X-сцепленных генов.

Минимальные диагностические признаки XX-дисгенезии гонад: кариотип 46,XX, наличие тяжевидных гонад при нормальном развитии наружных половых органов по женскому типу, аменорея, первичное бесплодие, гипергонадотроный гипогонадизм [Козлова, Демикова, 2007].

Клиническая картина: У большинства больных нормальное телосложение, вторичные половые признаки невыражены, первичное бесплодие, выраженный остеопороз. Уровень эстрогенов снижен, а ЛГ и ФСГ повышен.

Согласно выраженности фенотипических проявлений выделяют полную и неполную форму XX-дисгенезии гонад. По фенотипическим изменениям, клиническим проявлениям и генетическим нарушениям неполная форма XX-дисгенезии гонад перекрывается с синдромом *преждевременной недостаточности яичников*, *СПНЯ* (прежнее название – *синдром преждевременного истощения яичников*). Для СПНЯ также как неполной формы XX-дисгенезии гонад характерны: аменорея (но вторичная, возникающая в возрасте до 40 лет), нормальный рост, развитие органов половой системы по женскому типу, отсутствие маскулинизации, двойственности развития гениталий и признаков СШТ, нарушение оогенеза

(уменьшенное количество фолликулов и нарушение их созревания), высокий уровень ФСГ (выше 40 мЕд/мл) при нормальном уровне эстрадиола. В большинстве случаев обеих форм нарушений репродукции характерен нормальный женский кариотип (46,XX), однако также могут встречаться структурные перестройки и/или мозаицизм X, в частности интерстициальные и терминальные делеции.

1.5.9. XY-дисгенезия гонад.

Дисгенезия гонад при кариотипе 46,XY может быть синдромальной и несиндромальной. Синдромальные формы встречаются реже и характеризуются помимо аномалий половой системы, нарушением развития других органов и систем, например, поражением костной ткани (кампомелическая дисплазия), почек (синдром Денис-Дреша, синдром Фрезье, синдром WAGR), надпочечников (гипоплазия надпочечников).

Фенотипы нарушения дифференцировки гонад при кариотипе 46,XY варьируют от женского пола (первичного или “истинного” агонадизма) без или с признаками вирилизации, двойственного до мужского пола с одно- или двусторонним отсутствием тестикул [Rosenberg et al., 1984]. По степени нарушения дифференцировки гонад и развития по мужскому типу выделяют полную и неполную форму XY дисгенезии гонад. Полная, “чистая” форма (синдром Свайера, Swyer syndrome; OMIM 400044) является ‘несиндромальной’ и характеризуется отсутствием двойственности полового развития, неполная форма – наличием двойственности развития гениталий, которая может быть представлена в различной степени. Согласно классификации, предложенной Консенсусом 2006г. ее относят к группе НФП с кариотипом 46,XY, характеризующейся нарушением дифференцировки гонад. Гонады этих больных представляли собой соединительнотканые тяжи, располагающиеся высоко в малом тазу. Полная форма относится к нечастым аномалиям половой дифференцировки с XY-инверсией пола [Кирпатовский, Голубева, 1992; Касаткина, 1992]. Частота ее встречаемости составляет примерно 1 на 20 тыс. XY-индивидуумов.

Минимальные диагностические признаки полной формы XY-дисгенезии гонад: кариотип 46,XY, тяжевидные (стрек) гонады, наружные половые органы сформированы по женскому типу, возможна незначительная гипертрофия клитора.

Клиническая характеристика: Как правило, пациентов имеют высокий или выше среднего рост, маскулинное телосложение; отсутствие соматических экстрагенитальных аномалий, недоразвитие молочных желез. Наружные половые органы сформированы по женскому типу, но недоразвиты (при неполной форме – двойственное строение наружных гениталий). Вторичные половые признаки выражены слабо, скудное половое оволосение; у половозрелых пациентов первичная аменорея. Уровень эстрогенов и тестостерона снижен, а гонадотропинов повышен (гипергонадотропный гипогонадизм).

Внутренние половые органы развиты по женскому типу, гонады состоящие из соединительно-тканых элементов, матка, как правило гипоплазирована, маточные трубы недоразвиты. В 0-30% случаев обнаруживают развитие дисгерминомы или гонадобластомы из дисгенетичных гонад. Бесплодие у всех пациентов.

Дифференциальная диагностика: другие формы дисгенезии гонад, синдром Шерешевского-Тернера, мозаицизм 45,X/46,XY, синдром тестикулярной феминизации. Как правило, диагностирование синдрома Свайера происходит у девочек в пубертатный период, когда у них не происходит нормального полового развития. Причиной обращения к врачу при этом является задержка полового развития, отсутствие начала менструаций (аменорея), реже наличие злокачественных новообразований, происходящих из дисгенетичных гонад. Так как дисгенетичные гонады могут озлокачествиться, показано их удаление в детстве или на момент постановки диагноза дисгенезии гонад. После оперативного лечения пациенткам, как правило, в подростковом возрасте назначается заместительная гормональная терапия, чтобы достичь нормального развития вторичных половых признаков и предотвратить развитие остеопороза. У женщин с XY-дисгенезией гонад нет собственных яйцеклеток, однако в некоторых случаях описано вынашивание беременности (при невыраженной гипоплазии матки) после имплантации эмбрионов, полученных в программах ЭКО с донорскими яйцеклетками.

Кариотип у большинства пациентов – 46,XY, редко встречается кариотип 46,X,del(Yp11) или другие варианты. Наиболее частой из известных причин «чистой» формы дисгенезии гонад 46,XY являются микроструктурные перестройки Y-хромосомы с делецией локуса *SRY* (*Sex-determining region Y*), точковые мутации

данного гена. У 10-15% больных с синдромом Свайера обнаруживают отсутствие локуса *SRY*. В большинстве случаев это обусловлено утратой фрагмента дистальной части короткого плеча Y-хромосомы (Yp11.3), вследствие X-Y транслокации. Еще у 10-15% пациентов с данным синдромом выявляют его точковые мутации. Ген *SRY* локализован на коротком плече Y хромосомы и кодирует транскрипционный фактор – белок, связывающийся с генами, определяющими развитие пола плода по мужскому типу. Мутации в гене *SRY* приводят к синтезу функционально неполноценного белка и к нарушению дифференцировки клеток Сертоли и формирования семенных канальцев в развивающихся бипотенциальных гонадах плода, что вызывает дисгенезию гонад и развитие остальных органов половой системы по женскому типу, несмотря на наличие Y-хромосомы в кариотипе. В среднем мутации в гене *SRY* обнаружены у 15% больных с XY “чистой” формой дисгенезии гонад [McElreavey et al., 1992; Berta et al., 1990; Jager et al., 1990; Hawkins et al. 1992; Affara et al., 1993; Iida et al. 1994; Schmitt et al, 1995].

Описание семейных случаев “чистой” формы дисгенезии гонад [Simpson et al., 1981; Ferguson-Smith, 1991; Mendonca et al., 1994], а также случаев сегрегации мутаций гена *SRY* в семьях больных с XY “чистой” формой дисгенезии гонад [Jager et al., 1992], указывает на возможное участие аутосомных или X-сцепленных генов в развитии этой патологии. Кроме того было показана фенотипическая вариабельность при одинаковой мутации *SRY* у пораженных членов семьи [Vilain E. et al. 1992]. У трех пациентов отмечали XY инверсия пола (женский фенотип), а двое 46,XY пациентов имели мужской фенотип.

Помимо гена *SRY*, причинами нарушения развития дифференцировки гонад по мужскому типу при кариотипе 46,XY, а также нарушения развития половой системы, как у мужчин, так и у женщин (лиц с кариотипом как 46,XY, так и лиц с кариотипом 46,XX), могут являться мутации, делеции, дупликации ряда X-сцепленных и аутосомных генов (*SF1/NR5A1*, *DAX1/NR0B1*, *WNT4*, *WT1*, *SOX9*, *SOX3*, *DMRT1*, *DHH* и др.), контролирующих дифференцировку и развитие гонад [Mendonca et al., 2009]. Мутации в этих генах часто имеют доминантный тип наследования и приводят к различным нарушениям дифференцировки гонад и аномалиям формирования пола, а также экстрагенитальным поражениям, например,

почек, надпочечников, скелета, нервной системы. Нарушение функции данных генов может быть обусловлено наличием микроструктурных перестроек, в частности, микроделаций или микродупликаций, захватывающих соответствующие локусы, а также наличие точковых мутаций в этих генах.

1.5.10. Синдром тестикулярной дисгенезии

Нарушение развития тестикул может приводить к одно- или двустороннему их отсутствию яичек - *монорхии* или *анорхии*. Частота их встречаемости составляет 1 на 20000 и 1 на 5000 мужчин, соответственно. В настоящее время их расценивают как морфологические варианты *синдрома тестикулярной дисгенезии (СТД)*, характеризующегося нарушением дифференцировки и/или развития тестикул у пациентов, одно- или двусторонним отсутствием яичек, имеющих и генотипически (кариотип 46,XY) и фенотипически мужской пол. Диагноз 'СТД' подтверждается при исследовании органов мошонки, малого таза, пахового канала, гистологическом исследовании биоптатов гонад [Козлова, Демикова, 2007].

В научной литературе имеются различные термины, характеризующие врожденное отсутствие тестикул: синдром '*исчезающих яичек*' (*vanishing testis syndrome*)/синдром рудиментарных яичек (MIM273150) или синдром тестикулярной регрессии (MIM273250). Вероятно, анорхия или монорхия представляют собой различные морфологические варианты неполной формы XY-дисгенезии гонад, что подтверждает их наличие в некоторых семейных случаях [Josso, Briard, 1980].

Пациенты с СТД имеют наружные гениталии развитые по мужскому типу, но с отсутствием одного или обеих яичек. Возможна агенезия придатка яика и семявыносящего протока на стороне поражения. Как правило анорхию или монорхии обнаруживают в пубертатном возрасте в связи с гипогонадизмом и нарушением полового созревания, реже в допубертатном периоде или у взрослых вследствие бесплодия и/или проявлений гипогонадизма. У некоторых мужчин с монорхией фертильность сохранена. Гипоплазированные яички могут подвергаться тестикулярной регрессии и атрофии в постнатальном периоде, в частности при крипторхизме, при этом отмечают дефицит маскулинизации и первичный гипогонадизм: гипоплазия яичек, микропенис, отсутствие складчатости мошонки, низкий уровень тестерона и слабый ответ на стимуляцию ХГ, повышенные уровни ЛГ и ФСГ [Parisi et al., 2002].

В большинстве случаев причина СТД неизвестна. В единичных случаях описаны скрытый мозаицизм X/XY, структурные перестройки Y-хромосомы или мутации гена *SF-1/NR5A1* [Philibert et al., 2007; Cui et al., 2009]. Молекулярно-генетическое исследование генов *SRY*, *SF-1/NR5A1*, *INSL3*, *MAMLD1* и *LGR8* не выявило наличие их мутаций у мужчин с анорхией [Lobaccaro, 1993; Zenteno et al., 2001; Vinci et al, 2004; Brauner et al, 2011].

Таким образом, половые хромосомы у человека имеют фундаментальное значение в формировании пола, играя ведущую роль в детерминации пола. X- и Y-сцепленные гены занимают центральное место в генетическом контроле дифференцировке гонад и развитии репродуктивной системы, а также регуляции гаметогенеза. Гоносомные мутации являются частой причиной нарушений формирования пола, развития и функции репродуктивной системы. Они могут быть обусловлены как синдромами, вызванными численными и структурными аномалиями половых хромосом, так и несиндромальными формами. В отличие от регулярных гоносомных анеусомии, которые изучены в большей степени, многие типы структурных перестроек половых хромосом и гоносомного мозаицизма изучены недостаточно. Механизмы их образования, генетические эффекты и фенотипические проявления могут быть схожи или иметь различия. Для многих гоносомнообусловленных нарушений репродуктивной системы отмечена выраженная генетическая гетерогенность и фенотипическая вариабельность, а в ряде случаев, наоборот – схожесть их цитогенетических нарушений и клинических проявлений. Это может затруднять проведение диагностики, выбора пола, тактики ведения и лечения, определение гено-фенотипических корреляций и прогноза в отношении репродукции. Поэтому изучение частоты и спектра мутаций половых хромосом, их характеристика, а также разработка подходов и методов генетической диагностики у пациентов с нарушением формирования пола и репродукции является актуальной проблемой современной медицины.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ Медико-генетический научный центр (ФГБНУ «МГНЦ»), Москва.

Использованные в работе данные цитогенетического и молекулярно-генетического исследования получены в ходе проспективного исследования, а также ретроспективно на имеющимся материале препаратов хромосом и банков ДНК, внутренних документов, имеющихся в лаборатории генетики нарушений репродукции, лаборатории цитогенетики и лаборатории ДНК-диагностики, а также карт пациентов ФГБНУ «МГНЦ». При анализе спектра аномалий половых хромосом и цитогенетических вариантов у пациентов с различными гоносомными синдромами (Клайнфельтера, Шерешевского-Тернера, дисомии и полисомии Y, мозаицизм половым хромосомам и химеризм 46,XX/46,XY), у больных с гоносомнообусловленными формами нарушения формирования пола, а также мужчин с нарушением репродуктивной функции, имеющих аномалии гоносом, микроделеции Y-хромосомы у использовали данные архивов лаборатории генетики нарушений репродукции, лаборатории цитогенетики, а также медицинских карт пациентов поликлинического отделения, обратившихся для медико-генетического обследования и консультирования в ФГБУ «МГНЦ» за период 1989-2015 гг.

2.1. Характеристика выборки обследованных пациентов

Исследованную выборку составили 13640 пациентов с нарушением формирования пола, полового развития или репродуктивной функции. Из них: взрослые мужчины (10788), взрослые женщины (1625), дети (1227, мальчики – 626, девочки – 601). Кроме того в ходе исследования обследованы родственники пациентов (n=50), кроме того в единичных случаях была проведена пренатальная цитогенетическая или ДНК-диагностика. Среди детей возраст пациентов варьировал от 2 нед до 17 лет включительно, у взрослых от 18 до 62 лет.

В ходе исследования обследованы различные группы больных с нарушением формирования пола, нарушением репродуктивной функции и/или аномалиями половых хромосом. Характеристика отобранных групп пациентов с различными синдромами/гоносомными аномалиями приведена в таблице 2.

Характеристика обследованных отобранных групп пациентов.

Группа пациентов	Количество	Пол	Возраст
СШТ	323	Женский	0 – 45 лет
Синдром Клайнфельтера	222	Мужской	8 лет – 43 года
Мужчины с мозаицизмом X/XY и/или перестройками Y	87	Мужской	1 мес. – 35 лет
Дисомия-/полисомия Y	23	Мужской, n=21 Женский, n=2	1 год – 42 года
46,XX/46,XY	20	Мужской, n=10 Женский, n=10	2 мес. – 28 лет
XX-инверсия пола	68	Мужской	1 мес. – 52 года
XX-дисгенезия гонад	25	Женский, n=24 Мужской, n=1	1 год – 31 год
XY-дисгенезия гонад	66	Женский	1 год – 39 лет
Овотестикулярная форма НПФ	20	Мужской, n=10 Женский, n=10	2 года – 19 лет
Монорхизм, анорхизм	25	Мужской	2 мес. – 41 год

Отбор и обследование пациентов проводили в лабораториях генетики нарушений репродукции, общей цитогенетики, пренатальной диагностики, ДНК-диагностики, поликлиническом отделении ФГБУ «МГНЦ», а также в различных лечебных и диагностических учреждениях РФ. Обследование включало общеклиническое, андрологическое, гинекологическое и эндокринологическое обследование, сперматологический анализ и гистологическое исследование биоптата гонад, цитогенетическое исследование, молекулярно-цитогенетическое (FISH-анализ на лимфоцитах периферической крови, буккальном эпителии и сперматозоидах) и молекулярно-генетическое исследование (на ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови, буккальном эпителии и тканей биоптатов гонад).

Отбор и обследование пациентов выполнено совместно с зав. лаб. генетики нарушений репродукции ФГБНУ «МГНЦ» проф. Л.Ф. Курило, врачами-генетиками ФГБНУ «МГНЦ» к.м.н. Т.М. Сорокиной, к.м.н. Е.М. Гришиной, д.м.н., проф. Е.Л. Дадали, к.м.н. В.А. Галкиной, к.м.н. Е.Г. Окуневой, Л.А. Бессоновой, Деминой Н.А., Матющенко Г.Н., Петуховой М.С., зав. МГК г. Воронежа к.м.н. В.П. Федотовым, зав. отделением эндокринологии Республиканской детской клинической больницы (РДКБ, г. Москва) М.Е. Кармановым, к.м.н. Н.Ю. Райгородской (г. Саратов) и другим врачами, которым автор выражает свою глубокую признательность.

2.2. Общеклинические методы

В ходе клинического обследования проводили опрос (паспортные данные, жалобы, сбор анамнестических данных), осмотр. Степень зрелости полового развития оценивали согласно критериям, предложенным Таннером [Tanner, Whitehouse, 1966] (таблицы 1 и 2 Приложения). Для оценки массы и роста применяли массо-ростовой индекс (МРИ), определяемый по формуле: (фактическая масса/идеальная масса по росту и полу)×100%, для чего использовали перцентильные графические стандарты, полученные Национальным Центром по статистике здоровья (National Centre for Health Statistics – NCHS), и рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения, ВОЗ (WHO). Снижение МРИ ниже 90% от нормы считали отставание в физическом развитии.

2.3. Спермиологическое исследование

Стандартный спермиологический анализ выполняли по общепринятой методике, и его результаты оценивали согласно критериям Руководства ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью [WHO, 1999; 2010]. Согласно данным параметрам определяли режим половой активности, объем, цвет, вязкость и pH эякулята, количество сперматозоидов в 1 мл спермы, степень их подвижности по категориям (%), соотношение живых и мертвых сперматозоидов (%), патологические формы (%). Количественный анализ патологических форм сперматозоидов проводили по методу, предложенному Крюгером и соавторами (1986) [Kruger et al., 1986; Mortimer et al., 1982]. Заключение по результатам спермиологического анализа выполнено по критериям, предложенным рекомендациями Руководства по спермиологическому исследованию [WHO, 1999; 2010]. Нормативные значения показателей эякулята у здоровых (фертильных) мужчин и спермиологические заключения согласно критериям, предложенным в Руководствах ВОЗ в 1999 и 2010 гг, приведены в таблицах 3 и 4 Приложения, соответственно.

Количественный анализ незрелых половых клеток (КА НПК) проводили на препаратах половых клеток из эякулята по методу проф. Л.Ф. Курило, Патент на изобретение №2328736, 2007 г. [Курило и др., 1993, 1995; 1997]. Для проведения КА состава НПК использовали суховоздушные препараты половых клеток из эякулята, приготовленные по общепринятым методам [Evans et al., 1964; Templado

et al.,1996] и окрашенные красителем Гимза [Курило, 1985; Курило, Любашевская, 1993].

2.4. Гистологическое исследование биоптатов гонад

Материал гонад забирали путем биопсии в ходе оперативных вмешательств, выполненных в Тушинской детской больнице, Республиканской детской клинической больнице и других клиниках г. Москвы.

Гистологическое исследование биоптата гонад выполняли по стандартной методике. Полученные гистопрепараты окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином и анализировали с помощью световой микроскопии. Фрагменты ткани гонад, полученные при биопсии, погружали в приготовленный *ex tempore* фиксатор Буэна (на 6-36 часов). Фиксированные фрагменты биоптата отмывали от пикриновой кислоты в трех сменах 70% спирта. По завершении последовательной проводки через ряд спиртов восходящей концентрации (70%, 80%, 90%, 96%, 100%), ксилол, смесь ксилола с парафином (1:1), материал заливали в парафин. Использовали схему длительности проводки биоптатов гонад через названные жидкости, отработанную для яичников (Курило, 1985). Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха (2-5 мин) и эозином (5-10 мин), после чего заключали в канадский бальзам.

При морфологическом исследовании тестикулярной ткани обращали внимание на состояние оболочки и самих семенных канальцев яичка, в том числе на мембраны семенных канальцев, состояние клеток Сертоли, клеток сперматогенного эпителия (сперматогонии, сперматоциты на разных стадиях профазы I мейоза, метафазы I и II мейоза, сперматиды, сперматозоиды), а также на морфологические особенности клеток Лейдига и состояние стромы. Отмечали остановку процесса дифференцировки половых клеток на ранних стадиях профазы I мейоза, сперматоцитов I и II, сперматид. Учитывали также семенные канальцы, имеющие только клетки Сертоли, определяли наличие дегенерации соматических и половых клеток. При морфологическом исследовании овариальной ткани обращали внимание на состояние оболочки, наличия женских половых клеток на стадиях их развития, степень развития фолликулов. Стадию менструального цикла на момент выполнения биопсии определяли по состоянию желез эндометрия матки.

Спермиологическое и гистологическое исследование выполнено в лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ МГНЦ зав. лаб., д.б.н., проф. Л.Ф. Курило, в.н.с., д.б.н. Е.Е. Брагиной, к.б.н. Л.В. Шилейко, н.с. Остроумовой, к.б.н. Н.П. Макаровой, с.н.с., к.ф.-м.н. С.А. Рудневой, к.б.н. А.П. Савельевой, н.с. Штаут М.И., О.С. Панкратовой, которым автор выражает свою глубокую признательность.

2.5. Стандартное цитогенетическое исследование

Цитогенетическое исследование было проводили на препаратах метафазных хромосом, которые получали из лимфоцитов периферической крови, культивируемых в условиях *in vitro*, в соответствии со стандартной процедурой [Hungerford, 1965; Захаров и др., 1982]. GTG-, Q- и C-окрашивание хромосом выполняли по общепринятым методам в модификации [Захаров и др., 1982].

2.5.1. Культивирование лимфоцитов периферической крови

Забор материала для цитогенетического анализа осуществляли путем пункции локтевой вены одноразовыми шприцами, обработанными гепарином в концентрации 100 ед/мл. В стерильные флаконы с гепарином вносили 2 мл периферической крови. Затем в стерильных условиях, после добавления ФГА, сыворотки крупного рогатого скота и среды ИГЛА с глутамином, клетки культивировали в течение 72 часов при температуре 37°C и за 1,5 часа до фиксации добавляли колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. На 72 часу культивирования суспензию центрифугировали (1,5 тыс. об./мин.) в течение 7 минут. После ресуспензии клеток осадка после добавления подогретого до 37°C гипотонического раствора 0,55% KCl суспензию инкубировали в термостате (37°C) 15-20 мин.

2.5.2. Приготовление препаратов метафазных хромосом и интерфазных ядер

По окончании культивирования клетки с питательной средой переносили в центрифужные пробирки и осаждали центрифугированием в течение 5-ти минут при 1000-1500 оборотах в минуту. Полученный осадок подвергали гипотонической обработке 0,075 М раствором хлорида калия до 20 минут при температуре 37°C. Затем клетки фиксировали в трех сменах смеси метанол-уксусная кислота в

соотношении 3:1, приготовленной *ex tempore*, по 20 минут в каждой смене. Предметные стекла перед раскапыванием клеточной суспензии обрабатывали насыщенным раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте (хромпик) не менее 30 минут и промывали в проточной воде 30 минут. После последнего центрифугирования и удаления супернатанта, суспензию клеток раскапывали на охлажденные влажные предметные стекла и высушивали на воздухе.

2.5.3. G(GTG) окрашивание хромосом

G-окраску метафазных хромосом проводили с использованием 0,25% раствора трипсина по технике, приведенной Seabright [1971]. На каждые 10 мл раствора красителя Гимза на фосфатном буфере (pH – 6,8) добавляли 0,02 – 0,06 мл 0,25% раствора трипсина. Оптимальное время окрашивания препаратов подбирали эмпирически [Захаров и др., 1982].

Препараты хромосом помещали в 0,25% раствор трипсина на 10-30 секунд при комнатной температуре, затем трижды промывали в этиловом спирте в концентрации 70%, 96%, 100% с экспозицией не менее 30 секунд в каждом растворе. Препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре. Для окрашивания препаратов использовали 5% раствор красителя Гимзы, приготовленного на фосфатном буфере (pH 6.8). Длительность процедуры окрашивания составляла 4-5 минут. Затем препараты промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

2.5.4. C(CBG) окрашивание хромосом

Для C-окрашивания хромосом использовали общепринятый метод [Sumner, 1972]. Препараты хромосом обрабатывали насыщенным раствором гидрата окиси бария в течение 20 минут при комнатной температуре, ополаскивали под проточной водой и инкубировали 1,5 часа в растворе 10xSSC при температуре 65°C. Затем препараты дважды промывали в 70° и 96° этиловом спирте при экспозиции не менее 30 секунд в каждом и высушивали на воздухе. Окрашивание препаратов производили красителем Райта, приготовленном на фосфатном буфере (pH 6.8) в течение 7 минут.

2.5.5. Принцип анализа хромосомных препаратов

Отбор метафазных пластинок и анализ хромосом осуществляли согласно общепринятым критериям [Кулешов, 1991]. Результаты цитогенетического исследования приведены согласно Международной системе номенклатуры цитогенетики человека [ISCN, 1995; 2005; 2009; 2013].

В каждом случае анализировали не менее 11 метафазных пластинок. При обнаружении численной или структурной хромосомной аберрации в одной из клеток число анализируемых клеток увеличивали в два и более раза и/или применяли методы молекулярно-цитогенетической диагностики.

2.6. Молекулярно-цитогенетическое исследование

Интерфазный FISH-анализ проводили, основываясь на стандартной методике [Rooney, Czepulkowski, 1992]. Двухцветовая гибридизация *in situ* при этом существенно повышает разрешающие возможности FISH-анализа и позволяет однозначно дифференцировать тетраплоидию от любых других числовых аномалий хромосом. Для детекции анеуплоидии по половым хромосомам в интерфазных ядрах и метафазных препаратах использовали центромерспецифичные ДНК-зонды на хромосомы X и Y, DXZ1 и DYZ3, соответственно (Abbott Molecular Vysis Inc., США) (табл. 3).

Таблица 3

ДНК пробы, использованные для FISH анализа половых хромосом

Хромосома	Локализация сигнала	Название ДНК пробы
X	Xp11.1-Xq11.1	DXZ1
Y	Yp11.1-Yq11.1	DYZ3
	Yq12	DYZ1
	Yp11.3	SRY

Денатурацию препаратов хромосом проводили в 70% формамиде, 2xSSC при температуре 70°C в течение 30 секунд с последующим промыванием их в двух сменах 70% и 96% спиртов по 10 минут в каждом. Денатурацию ДНК проб осуществляли прогреванием в течение 5 минут при температуре 100°C на водяной бане в гибридизационной смеси, содержащей 50% формамид, 2xSSC, 10% декстрансульфат-500.

Гибридизацию in situ проводили последовательно следующими этапами:

Гибридизационную смесь по 10-15 мкл наносили на препараты, накрывали покровными стеклами размером 22x22 мм и инкубировали во влажной камере при температуре 37- 42°C в течение 17-18 часов.

После удаления покровных стекол препараты отмывали при температуре 39-42°C в двух сменах 50% формамида и 2xSSC в течение 10 минут, затем в двух сменах 2xSSC при комнатной температуре в течение 10 минут. Препараты не высушивали, а хранили в 0,01xSSC или фосфатном буфере.

Блокирующие антитела вводили, нанося 30 мл 4% раствора бычьего сывороточного альбумина или нежирного сухого молока в 4xSSC в концентрации 0,5% на препарат под покровное стекло размером 22x22 мм, и выдерживали в течение 15 минут во влажной камере при температуре 37°C.

Для детекции сигнала в случае ДНК проб, меченных биотином, на препараты наносили по 0,0125 мл FITC-avidin в концентрации 5 мкг/мл, накрывали покровными стеклами размером 22x22 мм и выдерживали во влажной камере 30 минут при температуре 37°C. Затем удаляли покровные стекла и промывали препараты в трех сменах 0,1 М раствора калий-фосфатного буфера (на 1 л 0,1М буфера - 94 мл 1М двузамещенного фосфата калия и 6 мл 1М однозамещенного фосфата калия с 0,1% раствором Тритон X-100, Tween-20 или Nonidet P40, pH 8.0).

Для амплификации сигнала на препараты наносили 0,0125 мл антиавидина (Anti-avidin в концентрации 5 мкг/мл), препараты накрывали покровными стеклами размером 22x22 мм и выдерживали во влажной камере 30 минут при температуре 37°C. Затем покровные стекла удаляли и препараты промывали в трех сменах 0,1М раствора калий-фосфатного буфера с 0,1% раствором Тритон X-100. После этого на препараты наносили по 0,0125 мл FITC-avidin в концентрации 5 мкг/мл, накрывали покровными стеклами размером 22x22 мм и выдерживали во влажной камере 30 минут при температуре 37°C. После удаления покровных стекол препараты промывали в трех сменах 0,1М раствора калий-фосфатного буфера с 0,1% раствором Тритон X-100, Tween 20 или Nonidet P40. Окраску препаратов производили нанесением 0,02 мл смеси, состоящей из 0,05 мл противовыцветающего реагента (DABCO), 0,05 мл 90% глицерина на 0,2М трис-HCl, 0,004 мл DAPI и 0,0048 мл пропидиума йодида; в случаях применения ДНК

пробы, меченной флуорофором Су3, пропидиум йодид для окрашивания препаратов не использовали.

2.6.1. Принцип на соматических клетках.анализа флюоресцентных сигналов после проведения флюоресцентной гибридизации *in situ*

Детекцию флюоресцентных сигналов проводили согласно стандартному протоколу FISH для проб, меченных биотином [Gall, Pardue, 1975]. При интерфазном анализе не учитывали клетки с диффузными гибридизационными сигналами, с нарушенной морфологией ядра или "размытыми" границами, а также в случае наложения (перекрывания) двух и более ядер. Два сигнала в ядре, расположенные близко друг к другу, считали дискретными, если расстояние между ними равнялось или превышало диаметр сигнала. Одиночный сигнал в ядре, интенсивность которого в два раза превышала интенсивность одного из двух сигналов, считался результатом ассоциации (наложения) двух сигналов. При интерфазном исследовании анализировали 300-600 клеток, при метафазном исследовании 50-100 метафазных пластинок для каждой ДНК пробы.

Анализ сигналов выполняли с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенного набором фильтров для детекции флуоресценции красителей DAPI, AQUA, FITC, Spectrum Orange. Фотографирование и анализ изображения проводили с помощью цифровой камеры CoolCube 1 и программного обеспечения для получения и обработки изображений – Isis Version 5.1 (Metasystems GmbH, Германия).

2.6.2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* на ядрах сперматозоидов

Молекулярно-цитогенетический анализ мужских половых клеток проводили по методике, предложенной Martin и соавторами [Martin et al., 1993, 1994]. Для оценки частоты встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией выполняли трехцветовую FISH, используя ДНК-зонды из коммерческого набора реактивов для диагностики анеуплоидий AneuVysion® (Abbott Molecular Vysis Inc., США), специфичные к альфа-сателлитным последовательностям центромерного и прицентромерного гетерохроматина хромосом 18, X и Y: CEP 18/D18Z1 (18p11.1-q11.1), Spectrum Aqua, CEP X/DXZ1 (Xp11.1-q11.1), Spectrum Green, CEP Y/DYZ3 (Yp11.1-q11.1), Spectrum Orange. Анализировали 1000-2000 сперматозоидов (в зависимости от концентрации сперматозоидов, у мужчин с концентрацией

сперматозоидов менее 1 млн/мл - все обнаруженные на препарате зрелые ПК), используя критерии, разработанные Williams и соавторами [Williams et al., 1993; Martin, Rademaker, 1995, Martin et al., 1996].

Методика гибридизации in situ на препаратах сперматозоидов:

Получение препаратов ядер мужских половых клеток из эякулята:

Эякулят инкубировали при температуре +37⁰С в течении 30 минут, затем растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.2) и центрифугировали при 3000 оборотов/мин. в течение 8-10 минут. Отбирали супернатант, осадок ресуспензировали в фиксаторе метанол/ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1 и оставляли при температуре -20⁰С. Проводили 3 смены фиксатора. Клеточную суспензию разводили в оптимальной концентрации и раскапывали пробу на охлажденные влажные предметные стекла.

Деконденсация хроматина сперматозоида:

Предметные стекла помещали в 5-25 mM раствор дитиотреитола (DTT) в буфере - 0,1 M Tris/1% Triton-X, pH 8.0 и инкубировали при температуре +37⁰С в течение 5-7 минут. Затем препараты отмывали в растворе 2×SSC 3 минуты. Препараты проводили через серию спиртов: 70%, 90% и 100%-ные растворы, при комнатной температуре по 1 мин. и просушивали на воздухе.

Препараты помещали на стол, нанося 100 мкл 3,7% раствора формальдегида, покрывали покровными стеклами и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Промывали в растворе 1×PBS в течение 3 мин. и проводили через серию восходящих спиртов. Высушивали препараты на воздухе.

Денатурация и гибридизация:

Наносили на препарат гибридизационную смесь, покрывали покровным стеклом, заклеивали края покровного стекла резиновым клеем, оберегая попадания прямого солнечного света. После высыхания клея, помещали стекла в предварительно прогретую (t +37⁰С) влажную камеру прибора для проведения гибридизации. Использовали прибор ThermoBrite™ Slide Denaturation/Hybridization System (200/240 VAC). Программа коденатурации/гибридизации составляла 4 минуты при +75⁰С с последующим охлаждением до +37⁰С и поддержанием температурного режима. Для эффективной гибридизации срок содержания препаратов в камере составлял приблизительно 1 сутки.

Постгибридизационные отмывки и контрастирующее флуоресцентное окрашивание клеточной ДНК:

- Предварительно сняв клей пинцетом, помещали предметное стекло на 30 минут в раствор неионогенного детергента 2×SSC/0,3% NP-40 pH 7.0-7.5 в темноте. Затем предметное стекло помещали на 2 - 4 минуты в раствор 2×SSC/0,3% NP-40 при +75⁰С. Переносили стекло в 2×SSC/0,3% NP-40 на 10 минут при комнатной температуре. Высушивали вертикально в течении 2-5 минут. На сухое стекло наносили заключающую среду (Antifade II), контрастирующий краситель DAPI II 5 мкл. Покрывали покровным стеклом.

Цитогенетическое исследование выполнено в лаборатории генетики нарушений репродукции, лаборатории цитогенетики ФГБНУ «МГНЦ» к.б.н. Л.С. Ширишовой, к.б.н. Т.Г. Цветковой, к.б.н. Н.В. Шиловой, д.б.н., проф. Т.В. Золотухиной, к.б.н. В.Г. Антоненко, к.б.н. Е.Г. Гордеевой, а также к.м.н. Ю.О. Козловой, к.м.н. М.Е. Минженковой, научными сотрудниками Н.Ю. Кузиной, Х.Д. Магомедовой, О.В. Барковой, Н.В. Опариной и другими цитогенетиками, которым автор выражает свою глубокую признательность.

2.7. Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование выполняли на ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови, буккального эпителия и биопсийного материала гонад. Образцы крови и ДНК пациентов были взяты из банка лаборатории генетики нарушений репродукции, лаборатории ДНК-диагностики и лаборатории эпигенетики ФГБНУ «МГНЦ», часть образцов была любезно предоставлена к.б.н. И.К. Гоголевской (Центр планирования семьи и репродукции, Москва), зав. отделением эндокринологии Республиканской детской клинической больницы (РДКБ, Москва) М.Е. Кармановым, зав. МГК г. Воронежа, к.м.н. В.П. Федотовым, которым автор выражает свою признательность.

Кровь у пациентов получали методом венопункции в одноразовые пластиковые пробирки с консервантом. В качестве консерванта использовали 0.5М раствор ЭДТА в соотношении консервант: кровь – 1:10.

2.7.1. Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови, буккального эпителия и фрагментов биоптатов гонад.

Выделение ДНК выполняли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, а также с помощью набора реагентов для выделения ДНК из различного биологического материала фирмы DIAtom™ DNA Prep 200 (Россия), а для незамороженных биологических образцов – с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Promega Promega BioSciences, США), согласно соответствующим протоколам производителей.

Для получения ДНК необходимой степени чистоты и достаточного молекулярного веса использовали метод выделения ДНК из крови, предложенный Lindblom, Holmlund (1988), с небольшими изменениями.

Кровь замораживали при $t -20^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. После размораживания к 1 мл крови добавляли равный объем 1xPBS, перемешивали и центрифугировали при 7000g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл 1xSSC и центрифугировали при тех же условиях. Затем удаляли супернатант, ядерный осадок растворяли в 1 мл раствора TE, pH 8.0. Добавляли раствор протеиназы K до конечной концентрации 50 мкг/мл и раствор SDS до конечной концентрации 0,5%. Образец тщательно перемешивали, затем инкубировали в течение ночи при 37°C . После этого последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, смеси “фенол-хлороформ” и хлороформа с центрифугированием при 5000g в течение 10 минут после каждого этапа. ДНК осаждали из раствора 2,5 объемами охлажденного 96% этанола. Образец выдерживали 30 мин. при -20°C . Сформированную ДНК растворяли в 50-200 мкл TE (pH 8.0).

2.7.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Принцип метода заключается в репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей нуклеиновых кислот и комплементарный синтез новых нитей ДНК. Метод ПЦР обеспечивает многократное приумножение (амплификацию, amplification — усиление, увеличение) в условиях *in vitro* фрагментов генома и быстрое накопление практически в любых количествах определенной, интересующей исследователя последовательности ДНК, которая первоначально может быть представлена всего лишь одной молекулой. В результате получают количество материала, достаточное для проведения анализа обычными методами детекции. Сущность метода ПЦР

составляет многократный циклический процесс, попеременно включающий полимеразную реакцию и денатурацию синтезированного фрагмента двунитевой ДНК и отжиг праймеров, что, в конечном счете, может привести к неограниченному увеличению исходного материала. Для определения наличия различных последовательностей (X-специфичных, Y-специфичных и X-Y гомологичных) применяли мультиплексную ПЦР (мПЦР) – мультиплексную амплификацию (МПА). В основе данной методики лежит принцип одновременной амплификации нескольких фрагментов ДНК.

Полимеразную цепную реакцию проводили на программируемом термоциклере МС2 производства фирмы “ДНК-технология” (Россия) с использованием ДНК-полимеразы *Termus aquaticus* производства института прикладной энзимологии “Ферментас” (Литва), а также ДНК-полимеразы *Biotaq* (“БиоМастер”, Россия).

2.7.3. Анализ локуса *SRY*

Для определения наличия локуса *SRY* применяли мПЦР с двумя парами праймеров, специфичных для последовательностей гена *SRY* и пары X/Y-гомологичных локусов *AMELX/AMELY* (табл. 4).

Таблица 4

Праймеры, использованные для анализа локусов *SRY*, *AMELX/Y*.

Локус	Последовательность праймеров	Длина фрагмента, п.н.
<i>SRY</i>	F 5'GACAATGCAATCATATGCTTCTGCT R 5'CTGTAGCGGTCCCGTTGCTGCGGTG	600
<i>AMELX</i> (<i>AMG</i>)	F 5'ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC R 5'GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	539
<i>AMELY</i> (<i>AMGL</i>)	F 5'GGCTGGGTGTTACCAGAAGGC R 5'TTCTTTCAC TGAACCGTATCTACC	365

Примечание: F – forward (прямой), R – reverse (обратный).

Вторая пара праймеров была выбрана по выравненным нуклеотидным последовательностям амелогенинового гена хромосомы X – *AMELX/AMG* и амелогениноподобной последовательности хромосомы Y – *AMELY/AMGL* [Nakahori et al. 1991]. Праймеры комплементарны гомологичным областям обеих последовательностей и ограничивают фрагменты различной длины (табл. 4). Разница в длине фрагментов обусловлена делецией из 177 п.н. в

последовательности *AMELY*. Праймеры на амелогениновые последовательности использовали для того, чтобы идентифицировать случаи делеции и транслокации гена *SRY*, а также случаи скрытого мозаицизма по Y хромосоме. В результате амплификации с контрольной мужской ДНК получали три фрагмента: длиной 600 п.н., 539 п.н. и 365 п.н., соответственно; с контрольной женской ДНК – только один фрагмент длиной 539 п.н., который специфичен для локуса *AMELX*, и использовали в качестве внутреннего положительного контроля реакции. Реакционная смесь для мультиплексной амплификации характеризовалась концентрацией $MgCl_2$ до 6 мМ и изменением объема до 25 мкл. Смесь нагревали в течение 5 минут при температуре 94°C, и проводили 32-35 циклов трехрежимной смены температур. Параметры одного цикла: денатурация при 94°C в течение 2 секунд, отжиг праймеров при 60°C в течение 2 секунд, синтез при 72°C в течение 5 секунд. Реакцию завершали инкубацией смеси при температуре 72°C в течении 7 минут.

Данное исследование выполнено в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МНЦГ» к.б.н. Н.Н. Вассерман, к.б.н. Т.С. Бескоровойной, Н.В. Комаровой и лаборатории эпигенетики ФГБНУ «МНЦГ» – к.б.н. О.В. Бабенко, которым автор выражает свою глубокую признательность.

2.7.4. Анализ последовательностей короткого плеча Y-хромосомы

С целью картирования точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы при различных макро- и микроструктурных ее перестройках, в частности у пациентов с *SRY*-позитивной XX-инверсией пола и *SRY*-негативной XY-инверсией пола (полной формой XY-дисгенезии гонад), применяли мультиплексную ПЦР набором праймеров, к следующим Y-специфичным маркерам Yp11: sY2062, sY1248, TGIF2LY-1, TGIF2LY-2, sY211, PCHDH11Y, sY1240, sY716, sY1241, sY1219 и sY1209. Список исследованных Y-специфичных локусов приведен в таблице 5 Приложения.

ПЦР проводили по следующей схеме: 0.1-1 мкг геномной ДНК, 0.25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата помещали в 25 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16,6mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01 % Twin-20, добавляли 1.5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 20-30 мкл минерального масла. Концентрация $MgCl_2$ была подобрана экспериментальным путем.

ПЦР проводили в следующем режиме:

первоначальная денатурация 950С - 2 минуты,

940С – 45 секунд,

650С – 45 секунд,

720С – 45 секунд,

финальная достройка 720С – 7 минут.

2.7.5. Анализ последовательностей длинного плеча Y-хромосомы

Для поиска микроделеций в локусе AZF применяли методику мультиплексной амплификации (МПА). Для детекции полных типов делеций в локусе AZF использовали набор праймеров, позволяющий исследовать девять STS-маркеров, специфичных для Y-хромосомы: *SRY*, *ZFY*, *sY84*, *sY86*, *sY127*, *sY134*, *sY254*, *sY255* и *sY615* (таблица 5 Приложения). Данная тест-система разработана в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» на основе предложенного консенсусного набора из восьми исследуемых маркеров, используемых при анализе микроделеций Y-хромосомы [Simoni et al., 1999]. Методика микроделеционного анализа была модифицирована: подобраны оригинальные олигонуклеотидные последовательности праймеров (кроме *ZFY*); полимеразную реакцию проводили одним мультиплексом (все девять пар праймеров); в набор добавлен дополнительный маркер – *sY615*, расположенный в дистальной области гена *DBY*, который чаще всего утрачивается при делециях региона AZFa [Foresta et al., 2000].

В качестве “внутреннего” контроля использовали два Y-специфичных маркера, позволяющих исследовать наличие в геномной ДНК пациентов последовательностей гена *SRY* (*sY14*) и пары X-Y гомологичных генов *ZFX/ZFY*. Определение присутствия гена *SRY* позволило оценить соответствие фенотипического (мужского) пола генотипическому, а *ZFY* – исключить возможность наличия транслокации гена *SRY* у пациентов, которым кариотип не был определен. В качестве “внешнего положительного” контроля использовали ДНК фертильного мужчины (контроль специфичности и чувствительности реакции), а внешнего отрицательного контроля (контроль наличия загрязнения образцов ДНК) применяли смесь реагентов, в которой вместо ДНК присутствовала

вода. Состав реакционной смеси и условия амплификации аналогичны описанным выше в разделе анализа последовательностей короткого плеча Y-хромосомы.

С целью анализа частичных делеций AZFa и AZFb регионов, а также картирования точек разрыва в длинном плече Y-хромосомы помимо набора маркеров для выявления полных AZF делеций, использовали различные мультиплексные ПЦР, исследуя наличие следующих STS-маркеров: sY82, sY1316, sY1234, sY87, sY88 (регион AZFa и его границы); sY182, sY95, sY98, sY102, sY106 (область между регионами AZFa и AZFb); sY1264, sY1237, sY1283, sY1235, sY121, sY124, sY1302, sY135, sY142, sY143 (регион AZFb и его границы); sY152, sY157, sY158, sY242, sY1192, sY1197, sY1206, sY1054, sY1125 (регион AZFc и его границы) и sY160 (гетерохроматин Yq12) (табл. 5 Приложения).

Для поиска частичных делеций региона AZFc Y-хромосомы использовали мультиплексную амплификацию, исследуя следующие Y-специфичные локусы: sY142, sY1197, sY1192, sY1206 и sY1125 (таблица 5 Приложения). Данный набор STS-маркеров были выбран из маркеров, использованных в исследованиях Kuroda-Kawaguchi и соавт. [2001] и Repping и соавт. [2002].

2.7.6. Электрофорез в полиакриламидном геле

Результаты полимеразной цепной реакции (амплификации) оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Разделение амплификационных фрагментов Y-специфичных ДНК-маркеров проводили на 7% ПААГ с соотношением акриламида и бисакриламида 29:1. Для заливки ПААГ готовили раствор следующего состава:

- 7 мл 30%-ного раствора 29 г АА и 1 г БА:
- 3 мл 10xTBE
- 20 мл дистиллированной воды.

Непосредственно перед заливкой геля в раствор добавляли 200 мкл 10%-ного ПСА и 25 мкл ТЕМЕД. В качестве электрофорезного буфера использовали 1xTBE. Проводили префорез в течение 20 мин.

Пробы для нанесения на гель готовили следующим образом: 10 мкл амплификата смешивали с 2 мкл буфера для нанесения, содержащего смесь маркерных красителей бромфенолового синего и ксилолцианола. В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК фага λ , рестрицированную PstI.

Проводили электрофорез при 15-18 В/см в течение 1-3 часов. После разделения фрагментов гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,1 мкг/мл в 1хТВЕ) в течение 20 минут, промывали водой и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм. Анализ и запись изображений полученных гелей проводили с использованием имеджин станции GEL DOC 2000 и пакета программ “QUANTITY ONE ®” фирмы “BIORAD” (Италия).

Молекулярно-генетический анализ микроделеций Y-хромосомы разработан совместно с зав. лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ проф. А.В. Поляковым и выполнен совместно с сотрудниками его лаборатории в.н.с., к.б.н. А.Л. Чухровой, к.б.н. О.П. Рыжковой, к.б.н. Т.С. Бескоровайной, к.б.н. С.В. Гудзенко, Е.В. Ильиной, Г.М. Баязутдиновой, которым автор выражает свою глубокую признательность.

2.7.7. Анализ QF-PCR (количественная флюоресцентная полимеразная цепная реакция, КФ-ПЦР)

С целью уточнения перестройки, определения происхождения мутации половых хромосомы, а также детекции химеризма (при кариотипе 46,XX/46,XY) и гоносомного мозаицизма использовали количественную флюоресцентную полимеразную цепную реакцию (КФ ПЦР, QF-PCR). Данный метод представляет собой мультиплексную ПЦР с использованием флуоресцентно-меченых праймеров, фланкирующих полиморфные короткие tandemные повторы (STR-локусы). Используемая в работе тест-система *АнПол-25* позволяла выявлять наличие наиболее частых типов анеуплоидий, включает 25 маркеров: по 5 маркеров на хромосомы 13, 18, 21, X; маркеры *4SH, AMELX/AMELY, SRY, ZFX/ZFY* – для определения генетического пола, маркер *TAFL* – для определения относительного количества хромосом X в геноме (табл. 5).

Для уточнения типа структурных перестроек и точек разрыва в хромосоме X использовали набор Investigator Argus X-12 (Qiagen, Нидерланды), позволявший исследовать 12 STR-маркеров X-хромосомы, а также локусы AMELX/Y.

Проводили мультиплексную ПЦР с праймерами для всех маркеров из соответствующих тест-систем в одной пробирке, а затем полученные продукты амплификации ДНК анализировали на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием программного обеспечения GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems, США).

Таблица 5

Характеристика маркеров, используемых в тест-системе *АнПол-25*

Маркер	Локализация	Гетерозиготность	Маркер	Локализация	Гетерозиготность
D13S252	13q12.2	0.74	D21S11	21q21.1	0.82
D13S305	13q13.3	0.79	D21S1409	21q21.2	0.74
D13S634	13q21.33	0.84	D21S1442	21q21.3	0.85
D13S800	13q22.1	0.72	D21S1435	21q21.3	0.74
D13S628	13q31.1	0.75	D21S1446	21q22.3	0.76
D18S819	18q11.2	0.73	DXS6803	Xq21.2	0.86
D18S535	18q12.3	0.77	XHPRT	Xq26.2	0.72
D18S978	18q12.3	0.71	DXS1187	Xq26.2	0.73
D18S386	18q22.1	0.92	DXS9896	Xq21.3	0.75
D18S390	18q22.3	0.69	DXS8378	Xp22.31	0.70
AMELX/AMELY	Xp22.22/Yp11.2	-	SRY	Yp11.31	-
4SH	Xp22.3/Yq11.2	-	TAFL	Xq21.1/3p24.2	-
ZFX/ZFY	Xq21/Yp11.2	-			

Данный раздел выполнен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ. Молекулярно-генетический анализ частых анеуплоидий разработан зав. лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ д.б.н., проф. А.В. Поляковым и выполнен в.н.с., к.б.н. А.Л. Чухровой, которой автор выражает свою глубокую признательность.

2.7.8. Анализ мутаций гена *SOX3*

ПЦР фрагмента кодирующей области гена *SOX3* (Xq27.1) проводили с парой праймеров; в качестве внутреннего контроля ПЦР выполняли амплификацию фрагмента промоторной области гена кадгерина *CDH1* (16q22.1) (табл. 6).

Таблица 6

Праймеры, использованные для ПЦР фрагмента кодирующей области гена *SOX3* и промоторной области гена кадгерина *CDH1*.

Локус	Последовательность праймеров	Длина фрагмента, п.н.
<i>SOX3</i>	F 5' CGTGTACGTGTCCAGGCGCTG R 5' CAAGACCAAGACGCTGCTCAA	151
<i>CDH1</i>	F 5' GCCCATCTCCAAAACGAACA R 5' GTTCCGACGCCACTGAGAGGG	362

ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл по следующей схеме: к 1 мкл геномной ДНК добавляли по 10 пмоль каждого олигопраймера из указанных в таблице; по 200 мкмоль каждого дезоксинуклеотидтрифосфата; 3% формамида; 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР (500мМ KCl, 100мМ трис-HCl, pH 8,4; 15 мМ MgCl₂), деионизованной воды до 25 мкл. Начальную денатурацию проводили при 98°C в течение 5 минут, затем в смесь добавляли 1 ед. акт. термофильной ДНК-полимеразы («Диалат», Россия) и проводили 33 цикла ПЦР при следующих условиях: денатурация: 95°C - 25 секунд, отжиг: 68°C – 45 секунд, элонгация: 72 °C - 90 секунд. ПЦР завершали инкубацией смеси при 72 °C в течение 10 мин.

Анализ продуктов ПЦР осуществляли путем их разделения в 8%-ном неденатурирующем ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра.

Данное исследование выполнено в лаборатории эпигенетики ФГБНУ «МНЦГ» д.б.н., доцентом В.В. Стрельниковым, которому автор выражает свою глубокую признательность.

2.7.9. Исследование CAG-повтора экзона 1 гена рецептора андрогенов (AR/HUMARA) и анализ инактивации хромосомы X

Для исследования инактивации (лайонизации) хромосомы X применяли подход, предложенный Allen et al. [1992]. Анализ паттерна метилирования выполняли на CAG-полиморфном локусе в экзоне 1 гена рецептора андрогенов (*AR, androgen receptor gene; HUMARA, human androgen receptor gene*) с определением соотношения инактивации хромосомы X – процентное соотношение количества клеток, несущих инактивированную хромосому материнского и отцовского происхождения (XCI ratio).

В качестве исследуемого материала использовали геномную ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови с помощью набора реактивов Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно протоколу производителя. Перед проведением ПЦР 250-500 нг геномной ДНК инкубировали с 20 ед. акт. метилчувствительной эндонуклеазы *HpaII* («Fermentas», Литва) в 1х буфере в общем объеме реакционной смеси 25 мкл в течении 20 ч. Амплификацию фрагментов ДНК, содержащих повтор (CAG)_n в экзоне 1 гена *AR*, проводили в двух пробирках (с ДНК, обработанной *HpaII*, и с необработанной ДНК) методом ПЦР на программируемом термоциклере MC2 («ДНК-технология», Россия) в 25

мкл объеме реакционной смеси следующего состава: 50-100 нг геномной ДНК в одной пробирке либо 5 мкл реакционной смеси ДНК с *HpaII* после инкубации в другой пробирке; по 0,25 мкМ каждого олигопраймера (нуклеотидная последовательность заимствована у Allen *et al.* [1992], обратный праймер мечен флуоресцентным красителем («SYNTOL», Россия); по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; 1 ед. акт. ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер», Россия); буфер для ПЦР (67 мМ Tris-HCl; 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄; MgCl₂ 2мМ, 0.01% Tween-20; рН 8.8); 20-30 мкл минерального масла. Проводили 33 цикла амплификации, каждый цикл включал инкубирование образцов при 94°C – 45с, 65°C – 45с и 72°C – 45с. Фрагменты ДНК, полученные в ходе ПЦР, разделяли с помощью прибора 3130 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems, США), амплитуду и площадь под кривой интенсивности флуоресценции оценивали с использованием программного обеспечения Genemapper (Applied Biosystems, США), для определения процентного соотношения активной и инактивированной хромосом X (XCI ratio) применяли формулу, описанную Volduc *et al.* [2008].

Данная часть работы выполнена в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» с.н.с., к.б.н. Е.А. Блинец, которой автор выражает свою глубокую признательность.

2.8. Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакетов компьютерных программ Biostat 2008 (AnalystSoft, США) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Данные проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения вычисляли групповое среднее арифметическое (M), стандартную ошибку среднего (SEM). Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. В качестве параметрического критерия использован критерий Стьюдента, в качестве непараметрического критерия – критерий Уилкоксона или критерий Манна-Уитни [Урбах, 1975; Glantz, 1999; Реброва, 2002]. Для проверки гипотезы о связи двух переменных использовали критерий Пирсона в случае нормального распределения данных, и коэффициент корреляций Спирмана в случае ненормального распределения данных. Различия считались значимыми при значении $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Частота хромосомных аномалий у пациентов с нарушением репродукции.

Нами проведен ретроспективный анализ результатов цитогенетического обследования у 6805 пациентов, обратившихся в лабораторию генетики нарушений репродукции ФГБНУ «МГНЦ» для медико-генетического обследования по поводу различных нарушений развития или функции репродуктивной системы за период 1995-2014 гг. Частота хромосомных мутаций составила 5,17% (4,51% - мутации гоносом и 0,66% мутации аутосом), среди них выявлено 307 мутаций половых хромосом количество которых от всех выявленных ХА составила 87,2%.

Частота мутаций половых хромосом или с их вовлечением варьировала в зависимости от группы взрослые – мужчины, женщины, дети (до 18 лет) – мальчики, девочки: 2,93%, 3,47%, 13,8% и 17,2%, соответственно (рис. 21). При этом среди детей с нарушением физического и/или полового развития частота мутаций гоносом (15,3%) значительно превышала соответствующий показатель у взрослых (3,1%).

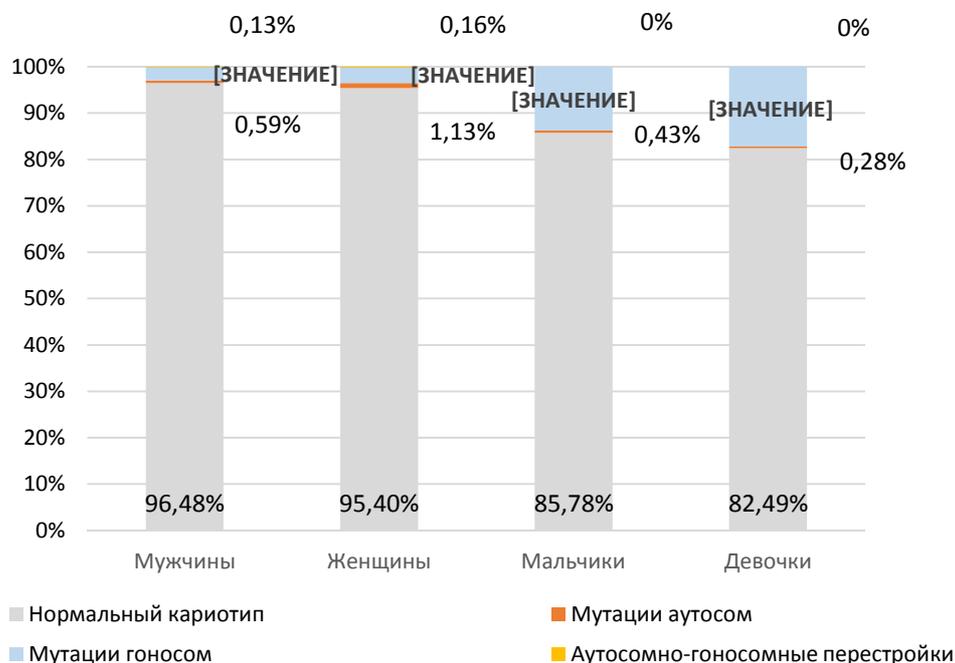


Рис. 21. Частота аномалий аутосом и половых хромосом в различных группах пациентов: мужчины и женщины с нарушением репродукции, дети с нарушением полового развития.

Результаты статистического анализа свидетельствовали о наличии значимых отличий по частоте аномалий половых хромосомы между взрослыми и детьми ($p < 0.001$; $\chi^2 = 243.247$), так и в различных возрастных группах лиц одного пола (мужского $p < 0.001$; $\chi^2 = 131.482$; или женского $p < 0.001$; $\chi^2 = 76.687$). Не выявлено значимых различий между группами пациентов разного пола одной и той же возрастной категории (мужчины и женщины – не выявлено значимого различия ($p > 0.1$; $\chi^2 = 2.273$; мальчики и девочки – не выявлено значимого различия ($p > 0.2$; $\chi^2 = 1.576$)).

Частота числовых и структурных перестроек половых хромосом от всех аномалий гоносом составили 87,5% и 12,5%, соответственно. Количественные мутации гоносом являлись наиболее частыми типами ХА во всех группах обследованных, при этом превалировала регулярная или мозачная анеуплоидия по хромосоме X, выявленная у 75,2% пациентов с аномалиями половых хромосом, в том числе у 93,5% пациентов с анеусомией по гоносомам без структурных их перестроек. У 0,13% мужчин и у 0,16% женщин с нарушением репродукции выявлены сбалансированные аутосомно-гоносомные перестройки (реципрокные X-аутосомные или Y-аутосомные транслокации). Среди детей с нарушением формирования пола подобных перестроек не обнаружено.

У пациентов мужского пола среди аномалий гоносом преобладала дисомия X/полисомия по гоносомам, среди пациентов женского пола моносомия полная или частичная X. Так в группах мужчин с нарушением репродукции и мальчиков с нарушением физического и/или полового развития частота синдрома Клайнфельтера и его цитогенетических вариантов составила 2,2% и 12,1%, соответственно. В группах женщин с нарушением репродукции и девочек с нарушением физического и/или полового развития частота моносомии X составила 1,2% и 5,9%, соответственно. Частичная моносомия X, обусловленная мозаицизмом по половым хромосомам и/или структурными перестройками гоносом выявлены в двух последних группах в 2,0% и 10,2%, соответственно.

Мозаицизм по половым хромосомам выявлен у 26,4% пациентов с аномалиями гоносом (рис. 22). Частота мозаицизма при наличии в кариотипе только числовых аномалий или в присутствии структурных перестроек половых хромосом составляла 19,9% и 56,1%, соответственно.

Таблица 7

Хромосомные мутации, выявленные у 6805 пациентов с нарушением развития/ функции репродуктивной системы.

Мутации хромосом, аномалии кариотипа	n
Сбалансированные перестройки аутосом:	45
Сбалансированные реципрокные транслокации аутосом	17
Робертсоновские транслокации	18
Инверсии аутосом	10
X-аутосомные и Y-аутосомные транслокации:	8
46,XX,t(X;5)(q26;q35)	1
46,XX,t(X;11)(q26;q12)	1
46,XY,t(X;4)(q12;p22)	1
46,XY,t(X;6)(q13;p22)	1
46,XY,t(14;Y)(p12;q12)	1
46,XY,t(5;Y)	1
45,X,-Y,der(22)t(Y;22)	1
46,X,t(20;Y)(p13;q11.21)	1
Количественные мутации половых хромосом:	249
47,XXY	152
47,XXY/46,XY	12
48,XXder(X)Y/47,XXY/46,XY	1
48,XXXY	3
45,X	36
45,X/46,XX	21
45,X/47,XXX	3
45,X/47,XXX/46,XX	1
47,XXX/48,XXXX/46,XX	1
47,XXX	1
47,XY	9
45,X/46,XY	7
46,XX/46,XY	2
Структурные перестройки половых хромосом:	39
Перестройки хромосомы X	23
45,X/46,X,r(X)	7
45,X/46,Xi(X)(q10)	5
46,X,i(X)(q10)	3
45,X/46,Xder(X)	1
46,X,der(X)t(X;X)(q22;p11.2)	1
46,X,del(X)(p11.4)	1
46,X,del(X)(q24)	1
46,X,add(X)(p21)	1
45,X/46,X,idic(X)(p11.2)	1
45,X/46,X,idic(X)(p22)	2
Перестройки хромосомы Y	16
46,X,del(Y)(q11.2)	5

Мутации хромосом, аномалии кариотипа	n
45,X/46,X,i(Yp)	1
46,XY,inv(Y)(q11;p11)	1
45,X/46,X,r(Y)	2
46,X,der(Y)	2
46,XY/46,X,der(Y)	2
45,X/46,X,idic(q11.2)	2
46,X,idic(Y)(q11.2)/47,X,idic(q11.2),+mar/47,X,idic(Y)(q11.2),idic(Y)(q11.2)	1
Маркерные хромосомы:	11
46,X,mar	2
47,XX,+mar	1
47,XY,+mar	1
45,X/46,X,mar	6
45,X/47,XY,+mar/46,XY	1
Всего:	352

Хромосомные варианты (гетероморфизмы) хромосомы Y выявлены примерно у 1% мужчин с нарушением репродуктивной функции. Среди них преобладал уменьшенный гетерохроматиновый блок длинного плеча Y-хромосомы, локус Yq12 (Yqh-), выявленный в 72% случаев, наличие увеличенного гетерохроматина (Yqh+) отмечено в 28% случаев полиморфизма Y-хромосомы.

Кроме аномалий половых хромосом среди обследованных различных групп нами выявлено несоответствие фенотипического пола генетическому (кариотипу). XX-инверсия пола (синдром 46,XX-мужчина или 46,XX-тестикулярная форма НФП), а также наличие мужского кариотипа у пациенток, имеющих фенотипический женский пол (46,XY дисгенезия гонад полная (чистая) форма некоторые формы 46,XY-НФП) обнаружены у 9 и 42 пациентов, соответственно. Следует учесть, что некоторая (особенно при XX-инверсии пола) их часть может быть обусловлена микроструктурными перестройками половых хромосом.

Кроме этого, среди цитогенетически обследованных нами взрослых анализ кариотипа выполнен у 38 пациентов с транссекуализмом (ТС). Из них 19 больных имели соматический мужской (ТС М→Ж), а 19 – женский (ТС Ж→М) пол. Транссекуализм в настоящее время рассматривают как одну из редких форм нарушения формирования пола у человека. Частота ТС составляет 1 на 10.000-100.000. Этиология данного заболевания остается неустановленной, но вероятно связана с генетическими факторами, нарушающими половую дифференцировку мозга [Курило и др., 2013]. Хромосомных мутаций у данных индивидуумов не

обнаружено, однако у одного пациента отнесенного к женскому полу выявлен кариотип 46,XY. Анализ анамнестических данных свидетельствовал о наличии у данного больного одной из форм 46,XY НФП, сопровождавшейся аномалией развития гениталий, по поводу которой больному проведено было проведено оперативное лечение.

Таким образом, хромосомные мутации обнаружены у 5,1% пациентов с нарушением репродукции. Большую часть выявленных ХА (87%) составили мутации половых хромосом. Их частота в группах пациентов с нарушением репродуктивной функции составила 2,9% и 3,8% среди мужчин и женщин, соответственно. Наибольшая частота ХА гоносом (15,3%) выявлена у детей с нарушением физического и/или полового развития хромосомные аномалии (ХА) выявлены у 13,8% пациентов мужского и у 17,2% пациентов женского пола. Количественные мутации гоносом являлись наиболее частыми типами ХА, при этом превалировала анеуплоидия по хромосоме X, выявленная у 55,8% пациентов с аномалиями половых хромосом. Частота гоносомного мозаицизма среди всех пациентов с аномалиями половых хромосом составила 27%, а среди носителей структурных перестроек хромосом X и Y – 58,2%. Хромосомные варианты хромосомы Y, связанные с измененным размером гетерохроматина Yq12 (Yqh-, 72%, Yqh+, 28%), выявлены у 0,5% мужчин с нарушением репродуктивной функции.

Так как в ходе работы были обследованы пациенты с различными синдромами и состояниями репродуктивной системы: больные с разными формами нарушений формирования пола (НФП) и/или полового развития, мужчины с нарушением репродуктивной функции, преимущественного с бесплодием, результаты работы, изложенные ниже, будут представлены по соответствующим группам больных.

3.2. Цитогенетическое и молекулярное обследование пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера и его вариантами.

3.2.1. Цитогенетическое обследование пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера.

Выборка больных с синдромом Шерешевского-Тернера (СШТ) для проведения молекулярно-генетического исследования была сформирована из 323 пациента с диагнозом или подозрением на синдром Шерешевского-Тернера, обратившихся в

ФГБНУ «МГНЦ» для медико-генетического обследования и консультирования за период 1995-2014гг., у которых был цитогенетически подтвержден диагноз СШТ. Данные обследования были собраны нами как ретроспективно, так и проспективно. Возраст больных варьировал от 0 (новорожденности) до 45 лет. За исключением 2 больных (девочки- монозиготные близнецы, имеющие регулярную моносомию X – кариотип 45,X), все обследованные пациенты с СШТ не являлись родственниками. У одной из пациенток с СШТ возрастом 14 лет был установлен кариотип 46,X,der(X), а у ее родной сестры 12 лет - диагностирована ‘чистая форма’ 46,XY-дисгенезии гонад. У первой из них отсутствовали последовательности Y-хромосомы, у второй - обнаружены все исследованные локусы Y-хромосомы, включая ген *SRY* (см. раздел ниже).

Всем пациентам с СШТ было проведено стандартное цитогенетическое исследование, в некоторых случаях это было сделано повторно, в связи с подозрением на наличие мозаицизма по половым хромосомам и/или уточнением структурной перестройки перестройки гоносом. Данные об обнаруженных кариотипах, их количестве и частоте различных цитогенетических вариантов в обследованной нами выборке больных с синдромом Шерешевского-Тернера приведены в таблице 8.

Таблица 8

Кариотипы и их частота у 323 пациентов с СШТ.

№	Кариотип	Кол-во	Кол-во	Доля вариантов
1	45,X	139	139	43,0%
2	mos 45,X/46,XX	29	29	9,0%
3	mos 45,X/47,XXX	8	8	2,5%
4	mos 45,X/46,XX/47,XXX	1	4	1,2%
5	mos 45,X/47,XXX/48,XXXX/46,XX	3		
6	46,X,i(X)(q10)	9	42	13,0%
7	mos 45,X/46,X,i(X)(q10)	28		
8	mos 45,X/46,X,i(X)(q10)/47,X,i(X)(q10)i(X)(q10)	3		
9	mos 45,X/46,XX/46,X,i(X)(q10)	2		
10	46,X,idic(X)(p11.2)	1	7	2,2%
11	46,X,idic(X)(p22.3)	1		
12	mos 45,X/46,X,idic(X)(p11.2)	3		
13	mos 45,X/46,X,idic(X)(p22)	1		
14	mos 45,X/46,X,idic(X)(q21.1)	1		
15	mos 45,X/46,X,r(X)	19	26	8,0%

№	Кариотип	Кол-во	Кол-во	Доля вариантов
16	mos 45,X/46,X,r(X?)	7		
17	46,X,del(X)(p11)	1	8	2,5%
18	46,X,del(X)(p11.1)	2		
19	46,X,del(X)(p11.2)	2		
20	46,X,del(X)(p11.3)	1		
21	46,X,del(X)(p21)	1		
22	46,X,del(X)(p11.4)	1		
23	46,X,del(X)(q13)	1	9	2,8%
24	46,X,del(X)(q13.2)	1		
25	46,X,del(X)(q13)/46,XX	1		
26	46,X,del(X)(q21.1)	3		
27	46,X,del(X)(q22)	1		
28	46,X,del(X)(q23)	1		
29	46,X,del(X)(q24)	1		
29	46,X,der(X)	3	4	1,2%
30	mos 45,X/46,X,der(X)	1		
31	46,X,mar	2	20	6,2%
32	mos 45,X/46,X,mar	18		
33	mos 45,X/46,X,mar/47,XY,+mar	1	27	8,4%
34	mos 45,X/46,XY	16		
35	mos 45,X/46,X,add(Y)(q12)	1		
36	mos 45,X/46,X,idel(Y)(q11.2)	3		
37	mos 45,X/46,X,idel(Y)(p11)	1		
38	mos 45,X/46,X,r(Y)	1		
39	46,X,i(Yq)	1		
40	mos 45,X,inv(10)(p11.2q21.1)/ 46,XY,inv(10)(p11.2q21.1)	1		
41	mos 45,X,inv(15)(p11q11)/46,XY,inv(15)(p11q11)	1		
42	mos 44,X,der(13;14)(q10;q10)/46,XY,der(13;14) (q10;q10)	1		
Итого:		323		100%

У больных с СШТ выявлено 42 различных кариотипа (табл. 8). С учетом количественных и структурных аномалий половых хромосом все цитогенетические варианты СШТ можно подразделить на 8 групп (табл. 9).

Группы цитогенетических вариантов СШТ:

- регулярная (немозаичная) моносомия X (45,X);
- мозаичная моносомия X без структурных перестроек X-хромосомы;
- мозаичная моносомия X со структурными перестройками X-хромосомы;
- моносомия X с мозаицизмом по нормальной хромосоме Y;

- моносомия X с мозаицизмом по перестроенной хромосоме Y;
- частичная моносомия X вследствие структурных перестроек хромосом X или Y без гоносомного мозаицизма;
- частичная моносомия X вследствие структурных перестроек хромосом X или Y с гоносомным мозаицизмом;
- наличие маркерной хромосомы (деривата X или Y) в регулярной или мозаичной форме (только до установления происхождения маркера).

Таблица 9

Группы цитогенетических вариантов СШТ по результатам стандартного цитогенетического исследования.

Цитогенетический вариант	Доля СШТ пациентов
Моносомия X, регулярная форма (45,X)	43,0%
Мозаицизм по хромосоме X с клоном 45,X и наличием клон(ов):	
с нормальной хромосомой X	12,7%
с aberrантной хромосомой (ами) X	20,4%
с нормальной хромосомой Y	5,9%
с aberrантной хромосомой (ами) Y	2,2%
СШТ с наличием в кариотипе перестроенной хромосомы X в регулярной форме	9,3%
СШТ с наличием в кариотипе маркерной хромосомы:	
в регулярной форме	0,6%
мозаичной форме	5,9%

Следует, однако отметить, что у некоторых больных не была установлена точная локализация точек разрыва в гоносомах и/или происхождение маркерной хромосомы (дериват хромосомы X или Y), а также что не всем пациентам с СШТ было выполнено молекулярно-цитогенетическое исследование, которое позволяет выявить случаи скрытого гоносомного мозаицизма.

Наиболее частый цитогенетический вариант синдрома Шерешевского-Тернера - регулярная форма моносомии X (кариотип 45,X) обнаружена у 139 из 323 (43%) пациентов. У 150 (46,4)% больных с СШТ при стандартном цитогенетическом исследовании выявлено наличие гоносомного мозаицизма с клоном 45,X (табл. 8, 9). По крайней мере у 110 (34%) пациентов обнаружены различные варианты

мозаицизма по хромосоме структурно нормальной или перестроенной хромосоме X, при этом преобладающим цитогенетическим вариантом являлся мозаицизм 45,X/46,XX, обнаруженный у 9% пациентов с СШТ (табл. 8). На диаграмме, изображенной на рисунке 23, показана структура (спектр) цитогенетических вариантов СШТ.

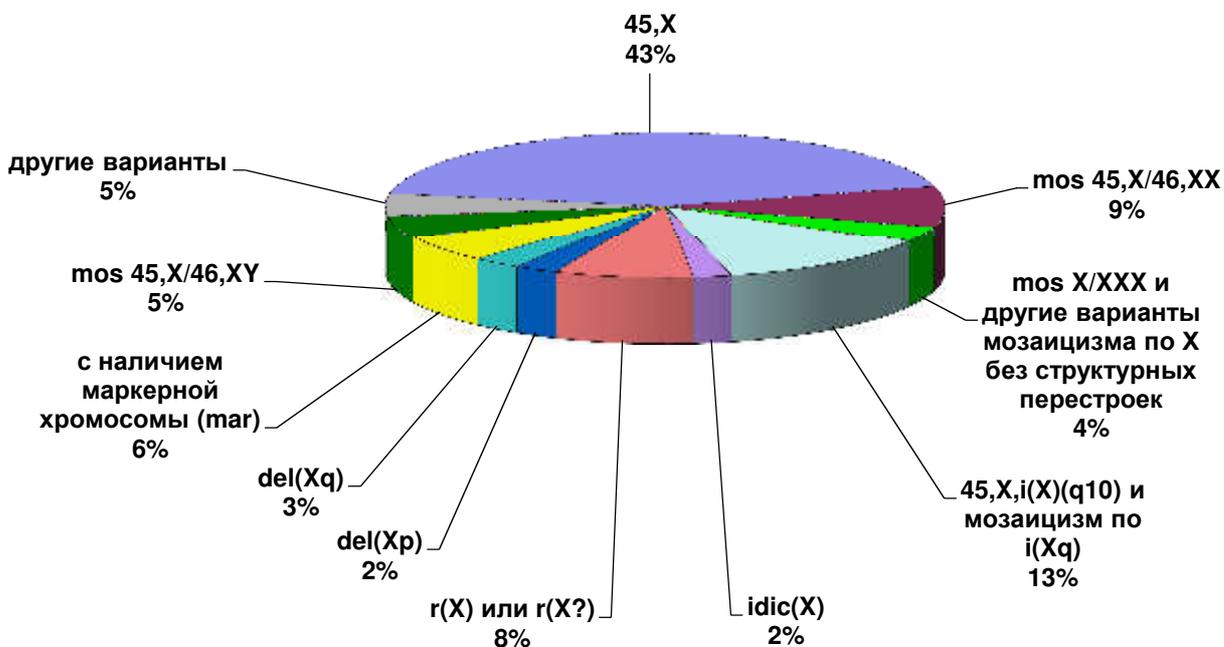


Рис. 23. Частота различных кариотипов (цитогенетических вариантов моносомии X), выявленных у больных с СШТ (n=323).

Присутствие в кариотипе перестроенной X-хромосомы в регулярной или мозаичной форме отмечено у 30 (9,3%) и 66 (20,4%) случаев, соответственно (табл. 9). Наличие сложного мозаицизма по хромосоме X выявлено у 2,8% пациентов с СШТ. Наиболее частой структурной перестройкой хромосом являлась изохромосома по длинному плечу X-хромосомы, i(X)(q10), обнаруженная у 13% больных. Изохромосома по длинному плечу Y-хромосомы, i(Y)(q10), являлась наиболее редкой структурной перестройкой гоносом, она была выявлена только у 1 (0,3%) пациента с СШТ.

Наличие Y-хромосомы в кариотипе установлено у 8,4% пациентов, при этом наиболее частым цитогенетическим вариантом СШТ являлся мозаицизм 45,X/46,XY, обнаруженный у 5% больных (табл. 8, 9). Кроме того, у 6,5% пациентов

данной группы выявлено наличие маркерной хромосомы, предположительно гоносомного происхождения (X или Y). Поскольку маркерные хромосомы (*mar*) при СШТ имеют гоносомное происхождение и представляют собой X-дериват или Y-дериват, то группа пациентов с СШТ и наличие маркера в регулярной или мозаичной форме является временной, только до момента идентификации маркерной хромосомы (X или Y), после которого кариотип пациента может быть отнесен в соответствующую ему группу СШТ (см. выше).

Другие аномалии кариотипа в группе обследованным нами больных данной группы были представлены сочетанием мозаицизма по хромосоме Y (X/X_Y и X/Y_Y) с наличием сбалансированных перестроек аутосом, обнаруженных в 3 (~1%) случаях СШТ (табл. 8). У двух пациентов выявлено наличие перичентрических инверсий аутосом, у одного – Робертсоновской транслокации (13;14). К сожалению, мы не исследовали родительское происхождение этих аутосомных перестроек из-за недоступности биологического материала от родителей. Не исключено, что их наличие могло являться предрасполагающим фактором, увеличивающим вероятность постзиготического нерасхождения гоносом.

Следует учитывать, что у части пациентов с СШТ, в частности при регулярной моносомии X, у которых не выявлено наличие мозаицизма при стандартном цитогенетическом исследовании по лимфоцитам периферической крови, возможно наличие скрытого гоносомного мозаицизма (по хромосоме X или Y), в том числе как межтканевого, так и внутритканевого, гонадного.

Учитывая, что маркерные хромосомы (*'mar'*) у пациентов с СШТ имеют гоносомную природу, что доли происхождения этих маркеров из хромосом X и Y примерно равны (этот показатель близким к 50%:50%), а также что доля кариотипов с маркерной хромосомой при СШТ невелика (составляет около 6% от всех цитогенетических вариантов СШТ), все цитогенетические варианты СШТ можно разделить на три большие группы:

1. Моносомия X, регулярная форма (45,X) (43%).
2. Моносомия X с мозаицизмом по нормальной или перестроенной хромосоме X (46%).
3. Моносомия X с мозаицизмом по нормальной или перестроенной хромосоме Y (11%).

3.2.2. Молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера.

Молекулярно-генетическое исследование выполнено у 109 пациентов с синдромом Шерешевского-Тернера. Анализ последовательностей короткого плеча (*SRY* и *AMELY*), и длинного плеча (маркеров из локуса *AZF*) Y-хромосомы проводили с целью детекции скрытого мозаицизма, верификации происхождения маркерных хромосом, а также для уточнения перестроек Y. Кариотипы и данные обследования больных данной группы приведены в таблице 10. Часть пациентов не входили в общую выборку пациентов с СШТ, биологический материал для их обследования был любезно предоставлен врачами-генетиками, цитогенетиками и эндокринологами различных медицинских учреждений.

Общая структура цитогенетических вариантов СШТ у пациентов, обследованных с привлечением молекулярно-цитогенетических и/или молекулярно-генетических методов, в целом отражала соотношение различных кариотипов, выявленных у пациентов с синдромом Шерешевского-Тернера (рис. 23).

Большинство больных также имела моносомию X (кариотип 45,X), обнаруженную при стандартном цитогенетическом исследовании у 36 (33%) обследованных. У 6 (5,5%) пациентов выявлен мозаицизм 45,X/46,XX, а у 15 (13,7%) – наличие в кариотипе структурных перестроек хромосомы X (табл. 10). Однако следует отметить, что в примерно у половины больных с СШТ, обследованных с привлечением молекулярных методов в кариотипе (по результатам стандартного цитогенетического исследования) была обнаружена Y-хромосома или маркерная хромосома. Так, у 21 (19,3%), 24 (22%) и 8 (7,3%) пациентов, в кариотипе присутствовала маркерная хромосома и/или нормальная или перестроенная Y-хромосома, соответственно. Данные пациенты были специально отобраны нами для выяснения происхождения маркерных хромосом и детального анализа материала Y-хромосомы.

За исключением одного пациента, имевшего изохромосому Yr в регулярной форме – кариотип 46,X,i(Y)(q10), все Y-позитивные пациенты имели мозаицизм по хромосоме Y (Табл. 10).

Таблица 10.

Результаты цитогенетического и молекулярного исследования у 109 пациентов с СПТ.

Кариотип	Кол-во больных	SRV (-)	SRV (+)	AMELY (+)	AZF (+)	Наличие последовательностей	
						Y-хромосомы	Доля, %
45,X ¹	36	30	6	6	6	6 ²	6/36 (16,7%)
mos 45,X/46,XX	6	6	-	-	-	0	0/6 (0,0%)
46,X,mar ³	6	4	2	2	2	2	10/20 (50,0%)
mos 45,X/46,X,mar ⁴	12	5	7	7	7	7	
mos 46,XX/46,X,mar	1	1	-	-	-	0	
mos 45,X/46,X,mar/46,X,i(X)(q10)	1	-	1	1	1	1	
46,X,del(X)(p11)	1	1	-	-	-	0	1/2 (50,0%)
46,X,del(X)(q22) ⁵	1	-	1	-	-	1	
46,X,i(X)(p10)	2	2	-	-	-	0	0/12 (0,0%)
mos 45,X/46,X,i(X)(p10)	2	2	-	-	-	0	
46,X,i(X)(q10)	2	2	-	-	-	0	
mos 45,X/46,X,i(X)(q10)	2	2	-	-	-	0	
mos 45,X/46,X,idic(Xp)	1	1	-	-	-	0	
mos 45,X/46,X,r(X)	3	3	-	-	-	0	
mos 45,X/46,XY	23	3	20	23	23	23	24/24 (100,0%)
mos 45,X,inv(15)(p11q11)/46,XY,inv(15)(p11q11)	1	-	1	1	1	1	
46,X,i(Y)(q10) ⁶	1	-	1	-	-	1	9/9 (100,0%)
mos 45,X/46,X,idic(Y)(p11)	1	1	-	-	-	1	
mos 45,X/46,X,idic(Y)(p11.3)	1	-	1	1	1	1	
mos 45,X/46,X,idic(Y)(q11.2)	2	-	2	2	2	2	

mos 45,X/46,X,del(Y)(q12) ⁷	2	-	2	2	2	2
mos 45,X/46,X,r(Y)	1	-	1	1	1	1
mos 45,X/46,X,mar/47,XY,mar	1	-	1	1	1	1
Всего	109	63	46	45	47	50
						50/109 (45,9%)

Примечание: По результатам повторного и/или дополнительного обследования кариотипы некоторых пациентов уточнены:

¹ – кариотип одного из пациентов mos 45,X/46,X,idel(Y)(q11.221)/47,X,idel(Y)(q11.221),idel(Y)(q11.221);

² – в одном из случаев скрытый мозаицизм по Y-хромосоме обнаружен только в гонадах; ³ – кариотип одного из пациентов mos

45,X/46,X,del(Y)(q12), другого – mos 45,X/46,X,idel(Y)(q12)/47,X,idel(Y)(q12),idel(Y)(q12); ⁴ – кариотип одного из (Y+)пациентов

mos 45,X/46,X,del(Y)(q11.2); ⁵ – у пациента обнаружена скрытая (SRY+) X-Y транслокация;

⁶ – кариотип пациента оценен как 46,X,idel(Y)(p11.2); ⁷ – у одного из пациентов с кариотипом mos 45,X/46,X,del(Y)(q12) при FISH исследовании обнаружен сложный гоносомный мозаицизм – mos

45,X(73,8%)/46,X,del(Y)(q11.2)(6,6%)/47,X,idel(Y)q11.2,idel(Y)q11.2,idel(Y)(q11.2)(13,8%)/48,X,idel(Y)q11.2,del(Y)(q11.2)(4,0%)/47,X,idel(Y)q11.2,idel(Y)(q11.2)(1,8%).

Однако, как выяснилось в ходе исследования, в данном случае имела место не изохромосома $i(Yq)$, а (псевдо)изодицентрическая хромосома по длинному плечу Y -хромосомы и кариотип пациента был окончательно оценен как $46,X,idic(Y)(p11.2)$. Наличие последовательностей, специфичных для Y -хромосомы, обнаружено у 50 из 109 (46%) больных с СШТ (рис. 24, табл. 10). Столь высокий процент обнаружения обусловлен спецификой выборки вследствие дизайна исследования: большим количеством пациентов с Y -хромосомой в кариотипе (33 пациента – по данным стандартного цитогенетического обследования), тем, что среди 20 обследованных носителей маркерных хромосом их происхождение из хромосом X и Y , соответствовало 1:1, таким образом у 10 пациентов маркеры (*mar*) являлись дериватами Y -хромосомы, у 10 – дериватами хромосомы X .

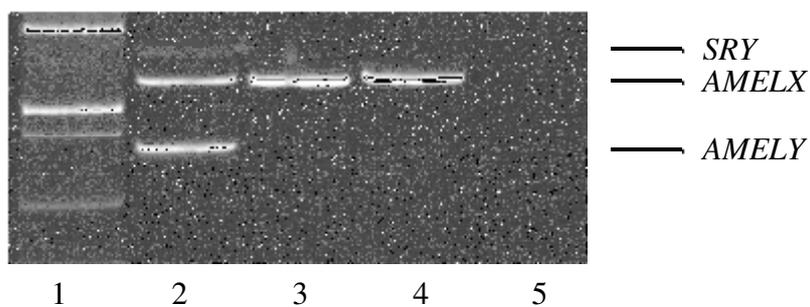


Рис. 24. Электрофореграмма результатов мультиплексной ПЦР.

Примечание: 1 – маркер молекулярного веса (Mr),

2 – положительный контроль,

К+ (ДНК мужчины с кариотипом $46,XY$),

3, 4 – пациенты с кариотипами $45X$ и $mos\ 45,X/46,XX$, соответственно,

5 – К- отрицательный контроль.

Кроме того с помощью молекулярно-генетического анализа установлено, что 1/6 всех пациентов с регулярной моносомией – $45,X$ (по данным стандартного цитогенетического исследования по лимфоцитам периферической крови) имеют скрытый мозаицизм с наличием короткого и длинного плеча хромосомы Y . В одном из случаев скрытый мозаицизм по Y -хромосоме обнаружен только в гонадах.

Среди больных с моносомией X (по данным анализа кариотипа) наличие последовательностей Y -хромосомы, специфичных для ее короткого и длинного плеча, в том числе гена *SRY*, обнаружено у 6 из 36 (16,7%) индивидуумов. Их детекция свидетельствует о наличии у данных больных скрытого мозаицизма по хромосоме Y .

Среди обследованных нами 45,X/46,XX мозаиков не было обнаружено Y-специфичных последовательностей (табл. 10). Среди пациентов с СШТ, имеющих различные типы структурных перестроек хромосомы X, наличие последовательностей короткого плеча Y-хромосомы выявлено только в одном случае. У данного пациента с первичным диагнозом синдром Шерешевского-Тернера, имевшего женский фенотип с признаками двойственного развития половых органов, при стандартном цитогенетическом исследовании был установлен кариотип - 46,X,del(X)(q22). При молекулярном анализе локусов *SRY*, *AMELX/AMELY* обнаружено наличие последовательности гена *SRY* и отсутствие локуса *AMELY*. Впоследствии пациенту было проведено молекулярно-цитогенетическое молекулярно-генетическое обследование, по результатам которого установлено, что перестроенная хромосома X представляет собой дериват хромосомы X, возникшей в результате уникальной Xq-Yr транслокации. Данный клинический случай является уникальным и будет детально описан ниже в разделе обследования пациентов с XX-дисгенезией гонад. Результаты FISH анализа у данной пациентки и 16 других пациенток с СШТ, которым проведено комплексное цитогенетическое обследование (стандартное цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование) приведены в таблице 11.

Таблица 11

Результаты цитогенетического и молекулярно-цитогенетического обследования у 17 пациентов с СШТ.

№	Кариотип (по результатам стандартного цитогенетического анализа)	Результаты молекулярно-цитогенетического исследования (FISH анализ)
1	45,X[20] (первично) mos45,X[20]/46,X,mar[10] (повторно)	ish psu idic(Y)(q12)(DYZ3++,DYZ1+), nuc ish(DXZ×1)[132]/(DXZ1×1,DYZ1×1, DYZ3×2)[64]/(DXZ1×1,DYZ1×2,DYZ3×4)[4]
2	46,X,del(X)(q22)*	ish der(X)t(X;Y)(q21.3p11.3)(DXZ1+,SRY+), nuc ish(DXZ1×2,SRY×1)[200]
3	mos 45,X/46,X,del(Y)(q12)	nuc ish(DXZ1×1)[369]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[69]/ (DXZ1,DYZ3)×1[33]/(DXZ1,DYZ3×3)[20]/ (DXZ×1,DYZ3×4)[9]
4	mos 45,X[8]/46,XY[47]	nuc ish(DXZ×1)[130]/(DXZ1×1,DYZ3×1)[370]
5	mos 45,X/46,XY, повторно - 46,XY	nuc ish(DXZ×1)[35]/(DXZ1×1,DYZ3×1)[465]
6	mos 45,X[26]/46,X,mar[24]	ish psu idic(Y)(p11)(DYZ3++), nuc ish (DXZ×1)[57]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[431]

№	Кариотип (по результатам стандартного цитогенетического анализа)	Результаты молекулярно-цитогенетического исследования (FISH анализ)
7	46,X,mar	ish der(Y)(DYZ3+), nuc ish(DXZ1×1)[260]/(DXZ1×1,DYZ3×1)[740]
8	46,X,mar	ish psu idic(Y)(q11.2)(DYZ3++,SRY++), nuc ish(DXZ1×1,DYZ3,SRY×2)[327]/ (DXZ1×1,DYZ3,SRY×4)[160]/(DXZ1×1)[10]
9	mos 45,X/46,X,mar	ish der(Y)(DYZ3+), nuc ish(DXZ1×1)[93]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[431]
10	45,X(первично)mos, 45,X[17]/46,X,mar[13] (повторно)	ish psu idic(Y)(q12)(DYZ3×2,SRY×2), nuc ish(DXZ1×1)[118]/(DXZ1×1,DYZ1×2, DYZ3×2)[182]
11	mos 45,X[10]/46,X,mar(derY?)[10]	ish idic(Y)(q12)(DYZ3++,SRY++), nuc ish(DXZ1×1)[132]/(DXZ1×1,DYZ1, DYZ3×2)[64]/(DXZ1×1,DYZ1×1,DYZ3×4)[4]
12	46,der(Y)	ish psu idic(Y)(p11.2)(DYZ3++,DYZ1++)
13	mos 45,X[8]/46,XY[21]	ish psu idic(Y)(q11.2)(DYZ3++,SRY++), nuc ish(DXZ1×1)[72]/(DXZ1×1,DYZ1, DYZ3×2)[228]/
14	mos 45,X[11]/46,XY[19]	nuc ish(DXZ1×1)[113]/(DXZ1×1,DYZ3×1)[187]
15	46,X,der(13;14)(q10;q10), mar,mar	ish der(Y)(DYZ3+,SRY+), nuc ish(DXZ1×1)[137]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[163]
16	mos 45,X[12]/46,X,r(Y?)[8]	ish r(X)(DXZ1+), nuc ish(DXZ1×1)[482]/(DXZ1×2)[118]
17	45,X/46,XX/47,XXX	nuc ish(DXZ1×1)[31]/(DXZ1×2)[855]/ (DXZ1×3)[14]

Примечание: * По результатам повторного обследования пациентка отнесена к группе больных с XX-дисгенезией гонад.

Происхождение маркера из Y-хромосомы установлено у 10 из 20 (50%) пациентов с СШТ (табл. 10, 11). В одном случае (мозаицизм 45,X/46,X,mar/47,XY,+mar) не удалось точно установить природу маркерной хромосомы (наиболее вероятно гоносомного происхождения), так как FISH анализ не проводили из-за недоступности биологического материала, а положительные результаты амплификации последовательностей Y-хромосомы не позволяют дифференцировать происхождение данного маркера (X-дериват или Y-дериват).

Из 10 больных СШТ, имевших в кариотипе маркерную хромосому (Y-дериват), в одном случае выявлен сложный гоносомный мозаицизм с наличием Y-деривата и изохромосомы Xq: mos 45,X/46,X,der(Y)/46,X,i(X)(q10). Среди больных, у которых гоносомный мозаицизм выявлен еще при стандартном цитогенетическом исследовании, обнаружено присутствие Y-хромосомы в

кариотипе у 3 из 21 (14,3%) пациентов с СШТ и мозаицизмом 45,X/46,XY (по результатам стандартного цитогенетического исследования) обнаружено отсутствие локуса *SRY*, что может быть обусловлено наличием интерстициальной или терминальной делеции Yp11.3, либо скрытой X;Y транслокации с образованием *der(Y)(Y;X)(p11.3;p22.3)*.

Отсутствие Yp-специфичных последовательностей (*SRY* и *AMELY*), выявлено также у пациента с кариотипом 46,X,*idic(Y)(p11.2)*, первично кариотип был определен как 46,X,*i(Y)(q10)*. В последнем случае, а также у пациента с мозаицизмом 45,X/46,X,*idic(Y)(p11)* обнаружено отсутствие локусов *SRY* и *AMELY* вследствие структурной перестройки Y-хромосомы с потерей фрагмента ее короткого плеча (табл. 10).

Для дополнительного молекулярно-генетического обследования – анализа цитогенетически идентифицированных структурных перестроек Y, в том числе Y-дериватных (маркерных) хромосом, поиск микроделеций при цитогенетически интактной хромосоме Y (у мозаиков 45,X/46,XY), а также с целью анализа материала Y-хромосомы у пациентов с кариотипом 45,X, у которых выявлен скрытый мозаицизм по Y-хромосоме, нами отобрана группа из 50 (Y+) позитивных пациентов с СШТ (табл. 12).

Присутствие последовательностей короткого плеча (*SRY*, *AMELY*, *ZFY*) Y-хромосомы обнаружено у 46 из 50 (92%) пациентов данной подгруппы. Отсутствие гена *SRY* обнаружено у 4 мозаиков по Y-хромосоме (45,X/46,X,*idic(Y)(p11)*, n=1; 45,X/46,XY, n=3).

Наличие гоносомного мозаицизма с наличием клона 45,X и клона(ов) с нормальной (цитогенетически интактной) или перестроенной хромосомой Y выявлено у 47 из 50 (94%) Y-позитивных пациентов с СШТ (табл.12). Среди остальных 3 (6%) пациентов, у которых не обнаружен мозаицизм, в кариотипе установлено наличие изодисцентрической хромосомы Y по длинному плечу (*idicYq*) или маркерной Y-дериватной хромосомы. При этом спектр и выраженность фенотических проявлений, характерных для СШТ, у пациентов с регулярной *idicYq* хромосомой зависят от количества потерянных «анти-Тернеровских» генов, что определяется расположением точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы.

Таблица 12

Результаты молекулярно-генетического Y-специфичных последовательностей хромосомы у 50 пациентов с СШТ, у которых обнаружена цитогенетически нормальная и перестроенная хромосома Y и/или явный или скрытый Y-позитивный мозаицизм.

Кариотип	Кол-во больных	Наличие (+) или отсутствие (del) локусов Yp11, n-число пациентов		Наличие (+) или делеции (del) AZF регионов			Выявленные случаи делеций Y-специфичных локусов (%)
		SRY	AMELY и/или ZFY	AZFa	AZFb	AZFc	
45,X ¹	6	+	+	+	del (n=4)	del (n=4)	4 ²
46,X,mar ³	2	+	+	+	+	+	-
mos 45,X/46,X,mar ⁴	7	+	+	+	+	+	-
mos 45,X/46,X,mar/46,X,i(X)(q10) ⁵	1	+	+	+	+	+	-
mos 45,X/46,XY	24	+(n=21), del (n=3)	+	+	+	+(n=23) del (n=1)	4
46,X,i(Y)(q10) ⁶	1	+	+	-	-	-	1
mos 45,X/46,X,idel(Y)(p11)	1	del	del	+	+	+	1
mos 45,X/46,X,idel(Y)(p11.3)	1	+	+	+	+	+	-
mos 45,X/46,X,idel(Y)(q11.2)	3	+	+	+	+	del (n=1) ⁷	1
mos 45,X/46,X,del(Y)(q12) ⁸	2	+	+	+	+	+	-
mos 45,X/46,X,r(Y)	1	+	+	+	+	+	-
mos 45,X/46,X,mar/47,XY,mar	1	+	+	+	+	+	-
Всего	50	+(n=46), del (n=4)	+(n=49), del (n=1)	+(n=49), del (n=1)	+(n=45), del (n=4)	+(n=43), del (n=6)	11 (22%)

Примечание: По результатам повторного и/или дополнительного обследования кариотипы некоторых пациентов были уточнены: 1 – кариотип одного из пациентов – mos 45,X/46,X,idel(Y)(q11.221)/47,X,idel(Y)(q11.221),idel(Y)(q11.221); 2 – в одном из случаев скрытый мозаицизм по Y-хромосоме обнаружен только в гонадах; 3 – кариотип одного из пациентов mos 45,X/46,X,del(Y)(q12), другого – mos 45,X/46,X,idel(Y)(q12)/47,X,idel(Y)(q12),idel(Y)(q12); 4 – кариотип одного из пациентов – mos 45,X/46,X,del(Y)(q11.2); 5 – маркерная хромосома (mar) – дериват, der(Y); 6 – кариотип пациента оценен как 46,X,idel(Y)(p11.2); 7 – частичная делеция AZFc (sY1206); 8 – у одного из пациентов с кариотипом mos 45,X/46,X,del(Y)(q12) при FISH исследовании обнаружен сложный гомосомный мозаицизм – mos 45,X(73,8%)/46,X,del(Y)(q11.2)(6,6%)/47,X,idel(Y)(q11.2),idel(Y)(q11.2),idel(Y)(q11.2),idel(Y)(q11.2),idel(Y)(q11.2)(1,8%).

Наличие клона 45,X не установлено у двух больных СШТ и наличием в кариотипе маркерной Y-дериатной хромосомой в регулярной форме. Возможно, данные пациенты имели скрытый гоносомный мозаицизм с клоном 45,X и/или их Y-дериатная хромосома утратила некоторые «анти-Тернеровские» гены.

Структура цитогенетических вариантов СШТ у (Y+) пациентов с синдромом Шерешевского-Тернера (n=50), выявленная при использовании молекулярных методов исследования, приведена на рисунке 25.

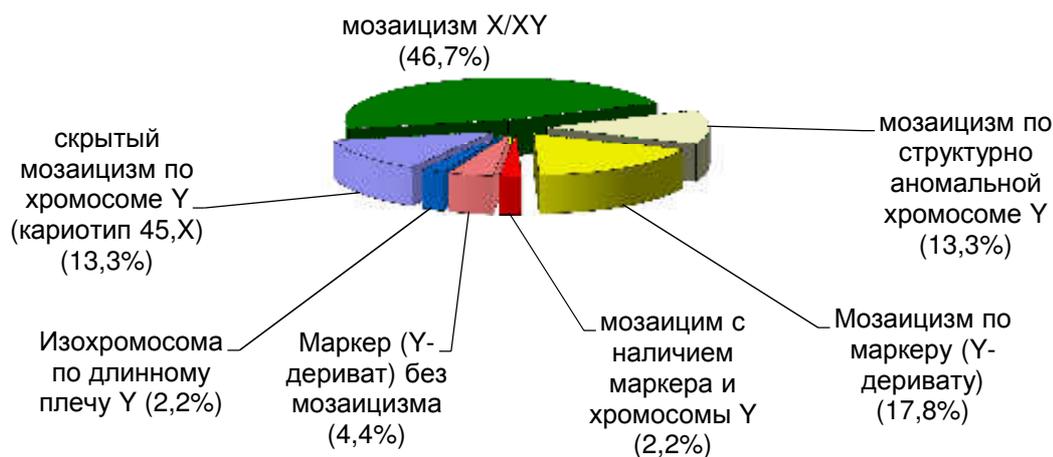


Рис. 25. Спектр (Y+) гоносомных аномалий у 50 пациентов с СШТ, которым проведен молекулярный анализ Y-хромосомы.

Следует отметить, что у 9 из 50 (18%) пациентов с СШТ (не учитывая случаи с идентифицированными маркерными хромососами) нами отмечено несовпадение результатов цитогенетического анализа (первичного и/или повторного анализа кариотипа) с результатами молекулярно-цитогенетического и/или молекулярно-генетического исследования. Их выполнение позволило выявить скрытый мозаицизм, идентифицировать маркерные хромосомы, уточнить характер перестройки половых хромосом. Практически во всех случаях комплексная молекулярная и цитогенетическая диагностика позволила уточнить тип перестройки и/или наличие и выраженность гоносомного мозаицизма.

У части СШТ пациентов с мозаицизмом по цитогенетически интактной, и особенно, перестроенной Y-хромосоме, при молекулярно-цитогенетическом исследовании обнаружен сложный гоносомный мозаицизм, в том числе с присутствием различных перестроек Y (например, терминальных делеций

длинного плеча и изодисетрических Yp хромосом), что свидетельствует о наличие в данных случаях динамического мозаицизма (табл. 12). Пример результатов FISH исследования у пациентки (код пациента AZF4856) с СШТ и первичным кариотипом mos45,X/46,X,del(Y)(q12) и микроделецией Y-хромосомы в регионе AZFc (sY1206): nuc ish(DXZ1×1)[369]/(DXZ1×1,DYZ3++)[69]/(DXZ1,DYZ3)×1[33]/(DXZ1,DYZ+++)[20]/(DXZ×1,DYZ3++++)[9], что соответствует кариотипу: mos45,X(73,8%)/46,X,del(Y)(q11.2)(6,6%)/47,X,idel(Y)q11.2,idel(Y)q11.2(13,8%)/48,X,idel(Y)q11.2,del(Y)(q11.2)(4,0%)/47,X,idel(Y)q11.2,+idel(Y)(q11.2)(1,8%).

При молекулярно-генетическом исследовании у данной пациентки обнаружено наличие генов *SRY*, *ZFX/ZFY*, а также всех STS-маркеров из локуса AZF за исключением одного маркера sY1206, что свидетельствовало о наличие редкой микроделеции в локусе Yq11.23, частично захватывающей AZFc регион Y-хромосомы. К сожалению кровь отца была недоступна для ДНК-исследования, поэтому характер происхождения данной микроделеции (*de novo* или унаследованная от отца) не был установлен.

Среди обследованных нами больных из различных групп выявлен ряд пациентов, представляющих особую значимость для исследования, поэтому описание нескольких уникальных и/или наиболее интересных клинических случаев (текст которых выделен курсивом).

Клинический случай 1:

Пациентка Ш.А. (AZF2177), 12 лет обратилась для повторного цитогенетического обследования в связи с подозрением на наличие мозаичной формы СШТ.

Диагноз при направлении: синдром Шерешевского-Тернера, гипергонадотропный гипогонадизм, задержка роста, гипоплазия щитовидной железы, субклинический гипотиреоз, коарктация аорты, двухстворчатый аортальный клапан, умеренный стеноз аортального клапана (состояние после радикальной операции: резекции коарктации аорты с наложением анастомоза конец в конец), хронический тонзилит, вальгусные стопы, нарушение осанки, остеопения.

Данные осмотра: рост 134 см (SDS – 1,93), вес – 34 кг, ИМТ (индекс массы тела) 18,94 кг/м². Широкая шея. Низкий рост волос сзади. Щитовидная грудная

клетка, вдавление в средней трети грудины. Укорочение мизинцев кистей. Ногтевые ложа утопленные на кистях и стопах. Признаки пубертата отсутствуют. Признаков дисфункции надпочечников не отмечено. Половые органы сформированы и развиты правильно по женскому типу. Половой статус: *Tanner I*.

Первично кариотип пациентки был определен как немозаичный: 45,X[20]. Повторный анализ кариотипа выявил мозаицизм с наличием маркерной хромосомы – mos45,X[20]/46,X,mar[10]. Поэтому ей было проведено молекулярно-генетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование.

Результаты FISH анализа: ish idic(Y)(q12)(DYZ3++,DYZ+1), nuc ish (DXZ×1)[132]/(DXZ1×1, DYZ1×1,DYZ3×2)[64]/ (DXZ1×1,DYZ1×2,DYZ3×4)[4], т.е. при анализе 200 интерфазных ядер выявлен сложный мозаицизм с наличием трех клонов: в 66% клеток обнаружен кариотип 45,X; в 32% - кариотип 46,X,idic(Y)(q12) и в 2% - кариотип 47,X,idic(Y)(q12),+idic(Y)(q12). Таким образом, установлено, что маркерная хромосома представляет собой Y-дериват – изодицентрическая хромосома Y_p.

При молекулярном анализе подтверждено наличие локусов *SRY*, *ZFY* и не обнаружено утраты какой-либо части эухроматина короткого или длинного плеча Y-хромосомы, что свидетельствовало о расположении точки разрыва в гетерохроматине Yq12 или на границе с дистальным эухроматином Yq11.23 и гететрохроматиновой областью Yq12.

Таким образом, согласно данным дополнительного исследования установлено, что маркерная хромосома является изодицентрической хромосомой Y по ее короткому плечу с точками разрыва в локусе Yq12. Заключительный диагноз: Нарушение формирования пола, синдром Шерешевского-Тернера, мозаичная форма. Кариотип окончательно определен как: mos45,X(32%)/46,X,idic(Y)(q12)(32%)/47,X,idic(Y)(q12),+idic(Y)(q12)(2%).

Несмотря на наличие достаточно высокого количества с 1-2 копиями дицентрической Y_p хромосомы, на каждой из которых присутствовали 2 копии гена *SRY*, у пациентки не отмечали двойственности развития наружных генитали и признаков маскулинизации. Вероятно, соотношение клонов, несущих разные наборы носом могло быть отличным от лимфоцитов периферической крови, при

этом представленность Y-несущих клонов была ниже, так как при уровне в гонадах 20-25% и выше высоко вероятно частичная дифференцировка гонад по мужскому типу и развитию овотестит или дисгенетичной гонады. Однако, так как биопсия гонад у данной пациентки не была выполнена, гистологический диагноз нарушения дифференцировки гонад остался невыясненным. Кроме того, причиной отсутствия двойственности развития половых органов у X/X_Y-мозаиков может быть связана с наличием дополнительной мутации, затрагивающей локусы или гены, ответственные за дифференцировку гонад и формирования пола по мужскому типу. Так, в редких случаях у пациентов с СШТ без признаков маскулинизации, имевших высокоуровневый мозаицизм по хромосоме Y, в том числе по idicY_p хромосоме, были обнаружены точечные мутации гена SRY [Takagi et al., 1999; Fernandez et al., 2002; Shahid et al., 2010]. Очевидно, что, если они произошли в еще до образования изодисцентрических хромосом Y, обе копии гена SRY на изохромосоме Y_p или изодисцентрической хромосоме Y_p будут нести одинаковую мутацию. В том случае, если мутацию имеет только одна из копий, соотношение генов SRY несущих и не несущих мутацию будет равно – 1:1, а мутация SRY возникла после образования дисцентрика [Fernandez et al., 2002].

Представленный клинический случай наглядно демонстрирует расхождение в результатах первичного цитогенетического обследования и данных, полученных при повторном генетическом обследовании больного, а также успешность использования комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического анализа у пациентов с гоносомными аномалиями.

Таким образом, в группе больных СШТ, обследованных с помощью стандартного цитогенетического анализа, наиболее частым цитогенетическим вариантом являлась регулярная моносомия X (45,X), обнаруженная у 43% пациенток. Мозаицизм по хромосоме X, наличие перестроенной X-хромосомы в кариотипе выявлено у 20,4% и 9,3%, соответственно. Наличие Y-хромосомы в кариотипе установлено у 8,4% пациенток. При этом наиболее частым Y+ цитогенетическим вариантом являлся мозаицизм 45,X/46,XY, обнаруженный у 5% больных. Структурные перестройки Y, выявленные с помощью анализа кариотипа, обнаружены у 2,2% больных. Кроме того, у 6,5% пациентов данной группы выявлено наличие маркерной хромосомы, гоносомного происхождения. В редких

случаях (около 1% пациенток) с СШТ обнаружено сочетание мозаицизма по хромосоме Y с наличием сбалансированных перестроек аутосом.

Наличие последовательностей, специфичных для Y-хромосомы, обнаружено с помощью ПЦР у 50 из 109 (45,9%) больных, отобранных для молекулярно-генетического исследования. Столь высокий % частоты Y-хромосомы, очевидно, обусловлен особенностями выборки. Наличие последовательностей Y-хромосомы, специфичных для ее короткого и длинного плеча, в том числе гена SRY, указывающее на скрытый мозаицизм по хромосоме Y обнаружено у 6 из 36 (16,7%) больных с моносомией X (по данным анализа кариотипа). Установлено, что соотношение маркерных хромосом ('mar'), происходящих из хромосом X и Y среди пациентов с СШТ, соответствует 50%:50%. Отсутствие гена SRY и делеции Yq11.2 обнаружены у 8 и 16% Y-позитивных пациенток с СШТ, соответственно.

3.3. Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов мужского пола со структурными перестройками Y-хромосомы и/или X/XU мозаицизмом, не имеющих гоносомных синдромов.

Среди обследованных у 87 пациентов (46 детей и 41 взрослый мужчина) в ходе комплексного обследования обнаружены мозаицизм X/XU (или его варианты) и/или различные структурные перестройки хромосомы Y (кроме сбалансированных – инверсий), маркерные хромосомы – предположительно происходящие из Y, а также Y-дериваты. Пациенты данной группы имели полностью мужской фенотип или какую-либо степень (от легкой до вырезанной) дефицита маскулинизации, все были зарегистрированы в мужском паспортном поле и не имели какого-либо гоносомных синдромов, овотестикулярной формы НФП и инверсии пола, поэтому были отобраны и рассмотрены в отдельной группе. Причиной обращения для медико-генетического обследования являлись нарушения формирования пола с различными диагнозами («дисгенезия гонад», «тестикулярный дисгенез», «дефицит маскулинизации», «гипоспадия», «крипторхизм», «задержка полового развития», «(первичный) гипогонадизм»), у взрослых мужчин – наличие первичного бесплодия в браке.

Все пациенты данной группы были поделены нами на 2 подгруппы: первая - дети с аномалиями формирования пола и/или гипогонадизмом, зарегистрированные в мужском паспортном поле; вторая – мужчины с первичным бесплодием в браке. Возраст пациентов варьировал от 1 мес до 17 лет и от 23 до 35 лет, соответственно.

Следует отметить, что у части обследованных из данной группы, в частности у некоторых X/X_Y мозаиков отмечены некоторые признаки синдрома Шерешевского-Тернера (СШТ), в частности низкий или ниже среднего рост, характерная форма грудной клетки, сосковый гипертелоризм, у большинства пациентов детского возраста и некоторых взрослых – признаки синдрома тестикулярного дисгенеза, дефицита маскулинизации, первичного гипогонадизма (гипоплазии яичек, сниженный уровень тестостерона, повышенный уровень ФСГ, у спермиологически обследованных мужчин – азооспермию или олигозооспермию).

Кариотипы пациентов данной группы по результатам первичного (стандартного) цитогенетического исследования приведены в таблице 13.

Таблица 13

Кариотип (по данным стандартного цитогенетического анализа) у 87 пациентов мужского пола с мозаицизмом X/X_Y и/или структурными аномалиями Y-хромосомы.

Кариотип (по результатам стандартного/первичного цитогенетического исследования)	Количество пациентов, n		
	мужчины	Мальчики	Всего
46,X _Y	1	4	5
46,X _Y q-	-	1	1
45,X/46,X _Y q-	-	1	1
46,X,del(Y)(q11.2)	15	3	18
45,X/46,X,del(Y)(q11.2)	3	3	6
46,X,del(Y)(q12)	1	-	1
45,X/46,X,del(Y)(q12)	-	1	1
45,X/46,X _Y	2	14	16
45,X/46,X _Y /47,X _{YY}	-	2	2
45,X/47,X _{YY} /46,XX/46,X _Y	-	1	1
45,X/46,X,r(Y)	1	-	1

Кариотип (по результатам стандартного/ первичного цитогенетического исследования)	Количество пациентов, n		
	мужчины	Мальчики	Всего
45,X/46,X,r(Y)/46,XY	1	-	1
46,X,i(Y)(p10)	-	1	1
45,X/46,X,i(Y)(p10)	-	1	1
45,X/46,X,idic(Y)(q10)	-	1	1
45,X/46,X,idic(Y)(q10)/47,XY,idic(Y)(q10)	-	1	1
46,X,idic(Y)(p11.3)	1	-	1
45,X/46,X,idic(Y)(p11.3)	-	1	1
45,X/46,X,idic(Y)(q11.2)	5	2	7
45,X/46,X,idic(Y)(q11.2)/46,X,del(Y)(q11.2)/ 47,X,idic(Y)(q11.2),+del(Y)(q11.2)/ 47,X,idic(Y)(q11.2),+idic(Y)(q11.2)	-	1	1
45,X/46,X,r(Y)/46,X,idic(Y)(p11)/ 47,X,idic(Y)(p11),+idic(Y)(p11)	-	1	1
46,X,der(Y)	3	-	3
45,X/46,X,der(Y)	1	1	2
46,X,mar	2	5	7
mos 45,X/46,X,mar	4	1	5
47,X,mar,+mar	1	-	1
Всего:	41	46	87

Результаты молекулярно-цитогенетического (FISH-анализ), выполненного у 23 пациентов, а также результаты молекулярно-генетического исследования – ПЦР анализ MSY-специфичных последовательностей короткого плеча (локусов *SRY*, *AMELY*) и длинного плеча (регионы AZFa, AZFb, AZFc) Y-хромосомы у пациентов данной группы, приведены в таблице 14.

Спектр аномалий кариотипа, выявленных по результатам комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического обследования пациентов данной группы приведен на рисунке 26.

Таблица 14

Результаты цитогенетического и молекулярно-цитогенетического обследования у 23 пациентов мужского пола со структурными перестройками и/или гоносомным мозаицизмом X/Y и его вариантами.

№	Код пациента	Кариотип (по результатам стандартного цитогенетического анализа)	Результаты молекулярно-цитогенетического исследования (FISH анализ)	Окончательно установленный кариотип
1	AZF786	46,X,mar	ish i(Y)(p10)(DYZ3+; DYZ1-; SRY++)[100]	46,X,i(Y)(p10)
2	AZF5711	46,X,mar	ish psu idic(Y)(q11.2)(SRY++, DYZ3++), nuc ish (DXZ1,DYZ3x2, SRYx2)[78]/ (DXZ1x1)[22]	mos 45,X(22%)/46,X,psu idic(Y)(q11.2)(78%)
3	X.A.	46,X,mar	ish der(Y)(DYZ3+), nuc ish (DXZ1x1)[42]/(DXZ1,DYZ3x1)[258]	mos 45,X(14%)/46,X,der(Y)(86%)
4	E.A.	46,X,mar	ish del(Y)(DYZ3+,SRY+,DYZ1-)	46,X,del(Y)(q11.2)
5	AZF5387	46,X,mar	ish psu idic(Y)(p11.32)(SRY++)	46,X,psu idic(Y)(p11.32)
6	cv129	46,X,mar	ish psu idic(Y)(q11.2)(SRY++,DYZ3++)	46,X,psu idic(Y)(q11.2)
7		46,X,mar	ish inv(Y)(p11.2q11.2)(DYZ3+,SRY+)	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)
8	AZF1050	mos 45,X/46,X,mar	nuc ish(DXZ1x1)[66]/(DXZ1,DYZ3x1)[120]/ (DXZ1,DYZ3x2)[108]/(DXZ1,DYZ3x3)[6]	mos 45,X(22%)/46,X,del(Y)(q11.2)(40%)/ 46,X,idic(Y)(q11.2)(36%)/ 47,X,idic(Y)(q11.2),+idic(Y)(q11.2)(2%)
9	AZF4461	47,X,mar,+mar	ish (Y)(p10)(SRY++,DYZ3+,DYZ1-), nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x1,SRYx2)[49]/ (DXZ1x1,DYZ3x2,SRYx4)[51]	mos 46,X,i(Y)(p10)(49%)/ 47,X,i(Y)(p10),i(Y)(p10)(51%)
10	AZF2881	46,XYq-	nuc ish (DXZ1x1)[11]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[189]	mos 45,X(5,5%)/46,XYq-(94,5%)
11	AZF621	mos 45,X[23]/46,XY[17]	ish psu dic(Y)(q11.2)(DYZ3++,DYZ1-;WCPY+) nuc ish(DXZ1x1)[159]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[141]	mos 45,X(53%)/ 46,X,psudic(Y)(q11.2)(47%)
12	J.I.K.	mos 45,X[21]/46,XY[9]	ish psu dic(Y)(q11.2)(DYZ3++), nuc ish (DXZ1x1)[160]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[40]	mos 45,X(80%)/46,X,psu dic(Y)(q11.2)(20%)
13	SRY176	mos 45,X[20]/47,XY[11]/ 46,XY[3]	nuc ish (DXZ1x1)[645]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[170]/ (DXZ1x1,DYZ3x1)[80]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[5]	mos 45,X(72%)/46,XY(18%)/47,XY(9%)/ 48,XYYY(1%)
14	AZF6585	mos 45,X[40]/ 46,X,idic(Y)(p11.3)[10]	ish psu idic(Y)(p11.3)(SRY+), nuc ish (DXZ1x1)(SRYx0,DYZ3x0)[39]/ (DXZ1x1)(SRYx1,DYZ3x1)[11]	mos 45,X(78%)/46,X,psu idic(Y)(p11.3)(22%)

№	Код пациента	Кариотип (по результатам стандартного цитогенетического анализа)	Результаты молекулярно-цитогенетического исследования (FISH анализ)	Окончательно установленный кариотип
15	К.И. 538	46,X,идic(Y)(q11.2)	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×2)[200]	46,X,psu idic(Y)(q11.2)
16		mos 45,X[13]/ 46,X,идic(Y)(q10)[36]/ 47,XY,идic(Y)(q10)[11]	ish idic(Y)(p11)(DYZ3++; DYZ1++), nuc ish (DXZ1×1; DYZ3×0)[93]/(DXZ1×1; DYZ3×2)[112]/(DXZ1×1;DYZ3×3)[15]/ (DXZ1×1; DYZ3×1)[30]	mos 45,X(37%)/46,X,идic(Y)(p11)(45%)/ 47,XY+idic(Y)(p11)(6%)/46,XY(12%)
17	AZF1476	mos 45,X[16]/ 46,X,del(Y)(q12)[14]	nuc ish (DXZ1×1)[57]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[93]	mos 45,X(38%)/46,X,идic(Y)(q12)(62%)
18	AZF1125	mos 46,X,идic(Y)(q11.2)[20]/ 45,X[10]/46,X,del(Y)(q11.2)[2]/ 47,X,идic(Y)(q11.2), +del(Y)(q11.2)[1]/ 47,X,идic(Y)(q11.2), +idic(Y)(q11.2)[1]	ish idic(Y)(q11.2)(DYZ3++, SRY++), nuc ish(DXZ1×1)[133]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[167]	mos 45,X(44%)/46,X,идic(Y)(q11.2)(56%)
19	AZF161	mos 45,X[7]/46,X,r(Y)[23]	nuc ish (DXZ1×1)[171]/(DXZ1×1,DYZ3×1)[129]	mos 45,X(57%)/46,X,r(Y)(43%)
20	AZF3958	mos 46,X,der(Y)[33]/45,X[7]	nuc ish(DXZ1×1)[51]/ (DXZ1×1,DYZ3×1,SRY×2)[249]	mos 46,X,идic(Y)(q11.2)(83%)/45,X(17%)
21	02185 П.Д.	mos 45,X/46,X,mar	nuc ish (DYZ1×1)[102]/ (DXZ1×1,DYZ3×2,SRY×2)[398]	45,X(20,4%)/46,X,идic(Y)(q11.2)(79,6%)
22	AZF45	46,XY	nuc ish (DXZ1×1,DYZ3×1)[494]/ (DXZ1×1,DYZ3×0)[6]	mos 45,X(1,2%)/46,XY(98,8%)
23	П.А.	mos 45,X[13]/ 46,X,идic(Y)(q10)[36]/ 47,XY,идic(Y)(q10)[11]	ish idic(Y)(p11)(DYZ3++;DYZ1++), nuc ish (DXZ1×1,DYZ3×0)[93]/ (DXZ1×1,DYZ3×2)[112]/ (DXZ1×1,DYZ3×3)[15]/(DXZ1×1,DYZ3×1)[30]	mos 45,X(37,2%)/46,X,идic(Y)(p11)/ 47,XY,идic(Y)(p11)(6%)/46,XY(12%)

Во всех 13 случаях маркерных хромосом у пациентов данной группы, их происхождение установлено из хромосомы Y. Они были представлены изохромосомой Yp (n=1), псевдодидцентрической хромосомой Yq в регулярной форме (n=1), псевдодидцентрической хромосомой Yp в регулярной (n=1) или мозаичной форме (n=1), делецией Yq и псевдодидцентрической хромосомой Yp в мозаичной форме (n=1), Y-дериватом с неуточненным типом структурной перестройки (n=7). У пациента с наличием двух маркерных хромосом (кариотип 47,X,mar,+mar) выявлен гоносомный мозаицизм с присутствием 2 клонов (50% : 50%): один – с 1 изохромосомой i(Yp) клеток, другой – с 2 изохромосомами i(Yp). Среди мужчин, у которых по данным цитогенетического исследования обнаружено наличие деривата Y, выявлено что перестроенная хромосома была представлена изодидцентрической хромосомой Yp, терминальной Yq11.2/Yq12 делецией или перидидцентрической инверсии Y.

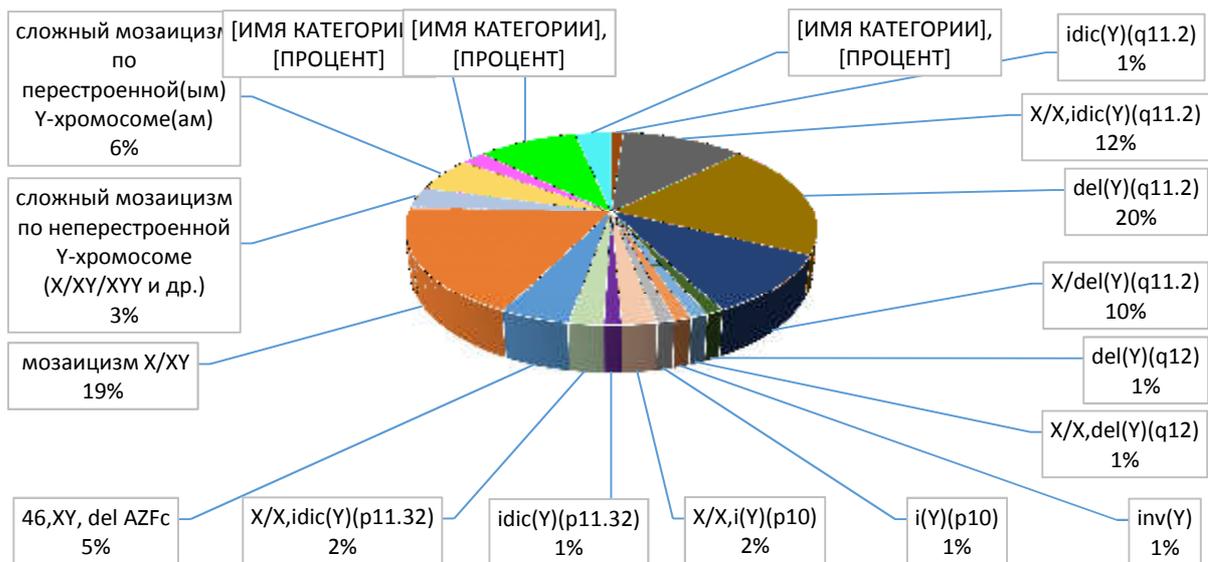


Рис. 26. Спектр (Y+) аномалий у 87 пациентов мужского пола со структурными перестройками Y-хромосомы и/или X/XY мозаицизмом, не имеющих гоносомных синдромов.

Согласно результатам повторного/комплексного обследования гоносомный мозаицизм в большинстве случаев представленный мозаицизмом X/XY и его вариантами) обнаружен у 58 из 87 (66,7%) пациентов. У 19 из 58 (32,8%) мозаиков выявлен мозаицизм по неперестроенной хромосоме Y (по данным цитогенетического исследования), а у остальных 39 (67,2%) мозаиков данной

группы – мозаицизм с наличием клон(ов) с перестроенной и/или неперестроенной хромосомой Y. Наличие сложного динамического мозаицизма с клетками, имеющими кариотип с различными несбалансированными перестройками Y (изохромосомы, дицентрики и кольцевые или терминальные делеции Yq) установлено, по крайней мере, у 6 (10,3%) мозаиков данной группы.

Из 3 пациентов, у которых обнаружено наличие Y-хромосомы в кариотипе в одном случае (у ребенка с НПФ) выявлен сложный мозаицизм с наличием 4 клонов, несущих различный набор гоносом: X; X,r(Y); X,idic(Yq); X,idic(Yq),+idic(Yq). Результаты ДНК-анализа свидетельствовали, что у него отсутствовали регионы AZFb и AZFc. У двух мужчин с кольцевой Y-хромосомой в кариотипе, имевших первичное бесплодие и секреторную форму азоосперии, не обнаружено микроделеций MSY региона, в том числе AZF локуса. В обоих случаях клон с кольцевой присутствовал клеточный клон 45,X, но у одного пациента (SRY161) гоносомный мозаицизм не характеризовался наличием клеток с кариотипом 46,XY (рис. 27, 28), в другом выявлено присутствие клон с неперестроенной хромосомой Y, что могло повлиять на детекцию AZF-делеций.

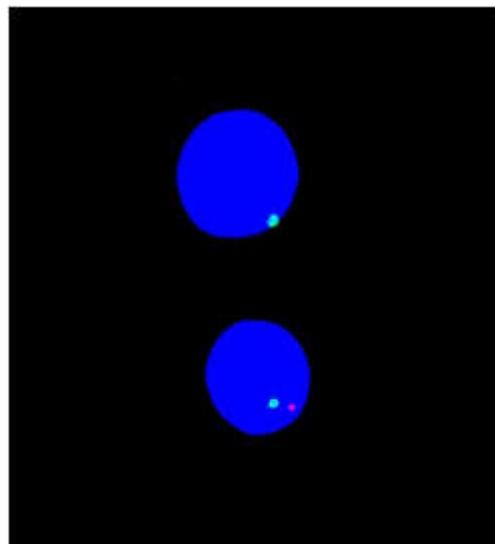
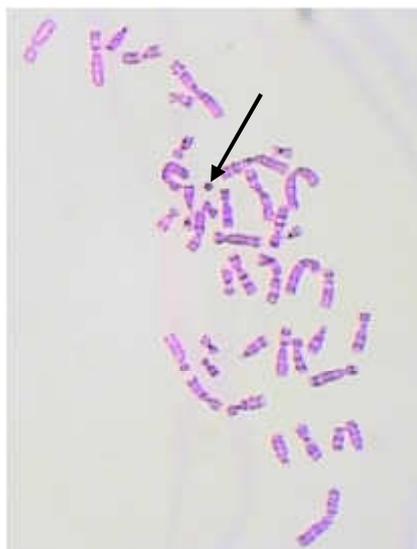


Рис. 27. Фрагмент метафазной пластинки цитогенетического анализа лимфоцитов периферической крови у пациента SRY161 (GTG-окрашивание). Кольцевая Y-хромосома указана стрелкой.

Рис. 28. Двухцветовая гибридизация *in situ*. X-хромосома – DXZ1 (зеленый сигнал), Y-хромосома – DYZ3 (красный сигнал).

Два из обследованных пациентов данной группы являлись родными братьями из двойни. У обоих по данным стандартного цитогенетического исследования в кариотипе помимо клона 46,XY обнаружено наличие минорного клона 45,X. Кариотипы пациентов: Ф.Н. - mos 45,X[3]/46,XY[77], Ф.Е. - mos 45,X[7]/46,XY[43]. По данным молекулярно-цитогенетического исследования на лимфоцитах периферической крови наличие мозаицизм не подтверждено: nuc ish (DXZ1,DYZ3)×1[200].

Среди пациентов репродуктивного возраста – мужчин с бесплодием, имеющих мозаицизм X/XY или его варианты, у которых было известно соотношение клеточных клонов, доля клеток с кариотипом 45,X значительно варьировала, составляя от 0,4% до 60% всех исследованных лимфоцитов периферической крови.

Молекулярно-генетическое исследование Y-хромосомы на наличие микроделений выполнено у 43 пациентов группы (табл. 15).

Таблица 15

Делеции в локусе AZF у детей и взрослых мужского пола с несбалансированными перестройками и/или мозаицизмом Y, не имеющие гоносомных синдромов.

Подгруппы пациентов, (количество обследованных)	Тип структурных перестроек Y-хромосомы	Тип AZF делеций					
		AZFa +b+c	AZFb+c	AZFc (b2/b4)	Всего полных	Частичные AZFc	Всего
«Дети» (n=22)	Интерстициальные (микроделении)	-	2	1	3	3	6
	Терминальные делеции	3	6	3	12	-	12
«Взрослые» (n=21)	Интерстициальные (микроделении)	-	1	1	2	-	2
	Терминальные делеции	1	11	2	14	-	14
Всего: 43		4	20	7	31	3	34

Полные AZF делеции обнаружены у 15 пациентов детского возраста и 16 пациентов взрослых. Результаты статистического анализа подтвердили отсутствие отличия в частоте AZF делеций между данными подгруппами ($p > 0.1$, $\phi^*_{эмп} = 0.06$).

Терминальные делеции длинного плеча Y-хромосомы, захватывающие регион AZFb и/или AZFc, обнаружены у 26 из 43 (60,5%) отобранных пациентов: у 14 из 21

(66,7%) мужчины с бесплодием, имеющих мозаицизм X/XY, и у 12 из 22 (54,5%) обследованных детей.

Важно отметить, что среди выявленных полных AZF делеций преобладали терминальные делеции (вследствие терминальных Yq делеций и дицентриков Yr с точками разрыва в Yq11.2), что привело к потере гетерохроматина Yq12 и большей части эухроматиной области длинного плеча Y-хромосомы с захватом всех трех регионов (делеция AZFa+b+c) или двух дистальных регионов локуса AZF (делеция AZFb+c). Делеция AZFb+c (P5-distal P1), выявленная у 20 из 43 (46,5%), составила 64,5% всех полных AZF делеций в данной группе. Наиболее распространенная среди мужчин с бесплодием делеция, целиком захватывающая регион AZFc, составила 22,6% от всех полных AZF делеций, обнаруженных в данной группе.

Наличие гена *SRY* обнаружено у всех мужчин с цитогенетическими перестройками и/или мозаицизмом по хромосоме за исключением одного пациента (SRY10), имевшего мозаичный кариотип 45,X/46,X,i(Y)(p10). Данный больной – ребенок 5 лет, зарегистрированный в мужском поле, имел двойственное развитие гениталий, наличие УГС, влагалище 5,5 см, левосторонний крипторхизм, справа в мошонке гонада (дисгенетичный тестикул?); рост 110 см, вес 15 кг. Отсутствие у него гена *SRY* было обусловлено потерей дистальной части короткого плеча Y-хромосомы (PAR1 региона и части дистальной части MSY-региона) вследствие возникновения изодицентрической хромосомы Y с точкой разрыва в Yr11.2, между локусами *SRY* и *AMELY* – кариотип mos 45,X/46,X,i(Y)(p11).

Делеции, захватывающие регионы AZFa, AZFb и/или AZFc, обнаружены у 34 из 43 (79%) пациентов группы, которым выполнен анализ микроделеций Y-хромосомы. Среди полных типов делеций обнаружены следующие: AZFa+b+c (n=4), AZFb+c (n=20), AZFc (n=7). Частичные делеции региона AZFc (gr/gr, n=1; b2/b3, n=2) выявлены у 3 пациентов, еще в двух случаях «точки», очевидно, располагались дистальнее данного региона. Преобладающим типом делеций в локусе AZF у пациентов данной группы являлись делеции AZFb+c, количество которых среди всех полных AZF делеций составила 64,5%. Столь высокий показатель, а также высокая частота AZFa+b+c делеций – 9,3% обусловлены особенностями выборки данной группы, в частности большим количеством пациентов с терминальными делециями Yq и изодицентрическими хромосомами Yr.

У 21 пациента с изохромосомами/изодицентрическими хромосомами по короткому плечу – $idic(Y)(q11.2)$, у 31 пациента, имевших цитогенетические терминальные делеции Yq ($Yq11.2$, $Yq12$), а также у некоторых из пациентов с дериватными хромосомами Y , обнаружена потеря части MSY -региона: части эухроматина $Yq11.2$ и/или дистального гетерохроматина ($Yq12$).

Следует отметить, что хотя обнаруженные делеции регионов AZF локуса в большинстве случаев оказались обусловлены цитогенетически идентифицированными перестройками Y -хромосомы с потерей части эухроматина $Yq11.2$, однако интерстициальные делеции – микроделеции $Yq11.23$ (полные или частичные делеции региона $AZFc$) также были обнаружены у некоторых пациентов, как с цитогенетическими перестройками Y , так и без них, в том числе у пациентов с мозаицизмом $45,X/46,XY$ и у пациентов с первичным кариотипом $46,XY$. Кроме того, в 3-х случаях (у одного пациента с делецией $Yq12$ и у двух пациентов с $i(Yr)$ изохромосомой) ПЦР анализ Yq -специфичных маркеров, свидетельствовал о потере региона $AZFc$ и сохранении региона $AZFa$, соответственно, что позволило уточнить точки разрыва и тип перестройки (в случае изохромосомы). Результаты молекулярно-генетического исследования позволили установить, что в первом случае делеция представляла собой терминальную делецию $Yq11.23$, а в двух других, что тип структурной перестройки Y -хромосомы соответствовал не изохромосоме Yr , а (псевдо)изодицентрической хромосоме $idicYr$. У двух SRY -положительных пациентов с дицентрической хромосомой по длинному плечу Y -хромосомы – кариотип $46,X,psu idic(Y)(p11.32)$, ее наличие подтверждено результатами FISH анализа (пациент $AZF5387$) или КФ-ПЦР (пациент $An357$).

У 6 пациентов мужского пола, имеющих мозаицизм по хромосоме Y с отсутствием ($n=2$) или наличием ее цитогенетически видимых структурных перестроек (Yr дицентриков) или микроделений, затрагивающих AZF locus (делений $AZFb+c$ или $AZFc$, $n=4$), выполнено цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование отцов пробандов. У обследованных отцов обнаружен нормальный мужской кариотип ($46,XY$), у трех – не обнаружено микроделений Y -хромосомы, а у трех выявлены частичные делеции региона $AZFc$ – делеции $b2/b3$. В 2 случаях у сыновей выявлен мозаицизм по цитогенетически неизменной

хромосоме Y (кариотип 45,X/46,XY), в одном сложный мозаицизм по Y-хромосоме с преобладающими клонами 49,XYYYY и 45,X (больной детально описан в разделе, посвященно обследованию пациентов с дисомией/полисомией Y). В последнем случае и у одного из пациентов с кариотипом 45,X/46,XY, установлено, что Yq11.23 микроделеция унаследована сыном в неизменном виде (делеция b2/b3), в другом – у сына возникла *de novo* более крупная микроструктурная перестройка – Yq11.22-11.23 микроделеция, с потерей регионов AZFb и AZFc и возникновением мозаицизма X/XY.

В таблице 16 приведена сравнительная характеристика пациентов (детей и взрослых) с X/XY мозаицизмом или его вариантами, зарегистрированные в мужском паспортном поле по генетическим и некоторым фенотипическим параметрам.

Таблица 16

Сравнительная характеристика двух групп пациентов с X/XY мозаицизмом или его вариантами: дети с аномалиями формирования пола и/или гипогонадизмом, зарегистрированные в мужском паспортном поле (группа «дети») и мужчины с первичным бесплодием в браке (группа «мужчины»).

Параметр	Пациенты с X/XY мозаицизмом или его вариантами, зарегистрированные в мужском поле	
	‘Дети’, n=22	‘Мужчины’, n=21
Кариотип	Мозаицизм 45,X/XY или его варианты	
% клона 45,X	2-57,5%	1-65%
Наличие гена SRY	У большинства (~93%)	У всех (100%)
Макроструктурные перестройки Y-хромосомы	45%	80%
Микроструктурные перестройки Y-хромосомы	27,3%	9,5%
Делеции AZF полные (интестициальные и терминальные)	54,5%	66,7%
Развитие гениталий	По мужскому типу (62%) или двойственное (38%)	По мужскому типу
Дисгенезия гонад	Встречается часто	Не характерна
Крипторхизм	Характерен	Не характерен

Гипоспадия	Характерна	Не характерна
Гипогонадизм (гипергонадотропный)	Характерен выраженный	Как правило умеренный, встречается не у всех
Половой инфантилизм	Характерен выраженный	Не характерен
Рост	Низкий	Ниже среднего
Признаки СШТ	Характерны, в том числе тяжелые формы	Встречаются редко

Среди больных детей интерсексуальное, двойственное или пол неопределенное развитие гениталий (*genitalia ambiguous*) установлено в 38% случаях (табл. 16). При этом нарушение развитие половых органов отмечли даже при незначительной выраженности клона 45,X (менее 5-10%) по данным цитогенетического исследования лимфоцитов периферической крови.

Среди взрослых пациентов не отмечено явных аномалий полового развития, несмотря на то, что выраженность (доля) клеточного клона 45,X у некоторых больных достигала 65%. Гипогонадизм диагностирован у большинства пациентов обеих подгрупп.

Отсутствие сперматозоидов (азооспермия) в эякуляте при проведении стандартного спермиологического исследовании обнаружено у 90% мужчин с X/XУ мозаицизмом вариантами. Наличие криптозооспермии или олигозооспермии тяжелой степени (с количеством сперматозоидов менее 1 млн/мл) выявлено у одного из взрослых пациентов группы. У обоих из них диагностирован гипергонадотропный (первичный), а также гоносомный мозаицизм: у одного *mos 45,X/46,XY/47,XYУ* без AZF делеций, у другого – *mos 45,X/46,X,der(Y)* и делецию AZFb+c.

Среди пациентов репродуктивного возраста – мужчин с бесплодием, имеющих мозаицизм X/XУ или его варианты, у которых было известно соотношение клеточных клонов, количество клеток с кариотипом 45,X значительно варьировало, составляя от 5% до 65% всех исследованных лимфоцитов периферической крови. Среди пациентов данной детского возраста, у которых было известно соотношение клеточных клонов, доля клеток с кариотипом 45,X также значительно варьировала, составляя от 0,4% до 60% всех исследованных лимфоцитов периферической крови.

У двух мальчиков из двойни (Ф.Н. и Ф.Е.), имевших возраст 2 года, отмечали наличие одностороннего крипторхизма разной локализации (справа или слева), признаки тестикулярного дисгенеза/смешанной дисгенезии гонад (Ф.Н.), наличие

дистально стволовой формы гипоспадии (Ф.Е.). Данные пациенты были рожденные от 1-ой беременности, наступившей после 2-ой программы ЭКО. Первая программа закончилась неудачей (отсутствие беременности). В анамнезе у матери бесплодие в течение 10 лет (сочетанное бесплодие женский фактор+мужской фактор). У матери удалены маточные трубы, у отца патозооспермия. Наследственность в семье отягощена по нарушению репродуктивной функции: у бабушки со стороны матери пробандов в анамнезе 2 выкидыша на ранних сроках беременности, у родного брата отца пробандов – бесплодие.

Молекулярно-цитогенетическое или комбинированное молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование позволили выяснить происхождение маркерных хромосом, определить или уточнить тип структурной перестройки Y-хромосомы, верифицировать/уточнить гоносомный мозаицизм. Один из примеров переоценки типа структурной перестройки приведен ниже.

Клинический случай 2:

Пациент К.И., 16 лет, впервые обратился к врачу поводу в возрасте 12 лет в связи с отставанием в физическом развитии и половом созревании, избыточной массой тела. При осмотре в 16 лет: рост - 166 см, вес - 70,8 кг, ИМТ - 25,74 (SDS - 1,13). Половые органы сформированы по мужскому типу, но развиты недостаточно. Половой статус: Tanner II.

Проведено эндокринологическое обследование - пробы с дифферелином и хорионическим гонадотропином (ХГ по 5 тыс. Ед., 3 дня, в/м), которые свидетельствовали о выраженном подъеме гонадотропных гонадотропных гормонов (ЛГ выше 10 мМЕ/мл) и свободного тестостерона до 69,15 нмоль/л (норма 15,5-102,0 нмоль/л), соответственно. Костный возраст по данным рентгенологического исследования соответствовал 13,5-14 годам. Пациенту был поставлен диагноз: Задержка физического и полового развития, конституционально-эндогенное ожирение I ст., Метаболический синдром. Проведен курс инъекций ХГ (n=10), на фоне которого отмечено увеличение размеров тестикул, гиперемия мошонки, утренние эрекции. Размеры яичек после лечения (по данным УЗИ) слева – 29×15 мм, справа 25,5×13 мм, паренхима однородная с четко дифференцирующимися придатками яичек.

Пациенту К.И. проведено цитогенетическое обследование. Кариотип: mos

45,X[16]/46,X,del(Y)(q12) [14]. Дополнительно выполнено молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование. Результаты FISH анализа: nuc ish (DXZ1×1)[57]/(DXZ1×1,DYZ3×2)[93] (первичный); ish idic(Y)(q11.2)(DYZ3×2, SRY×2), nuc ish(DXZ1×1)[133]/(DXZ1×1,DYZ3×2) [167] (повторный), т.е. mos 45,X(44%)/46,X,idic(Y)(q11.2) (56%).

Результаты молекулярного анализа Y-хромосомы свидетельствовали о наличии терминальной делеций в локусе Yq11.2 с потерей регионов AZFb и AZFc (отсутствие маркеров sY121, sY124, sY127, sY134, sY1302 региона AZFb и всех исследованных маркеров региона AZFc). Результаты роверденного у отца пробанда обследования свидетельствовали о наличии у него нормального мужского кариотипа (46,XY) и отсутствии мкироделеций Y-хромосомы.

Таким образом, согласно данным дополнительного исследования установлено, что возникшая de novo перестроенная хромосома является изодисцентрической хромосомой Y по ее короткому плечу с точками разрыва в локусе Yq11.22 (регион AZFb). Окончательный диагноз: НФП, тестикулярный дисгенез, вследствие гоносомного мозаицизма, первичный гипогонадизм.

Таким образом, в группе пациентов мужского пола со структурными перестройками Y-хромосомы и X/XY мозаицизмом, наличие гена SRY обнаружено в 98,3%. У единственного SRY-негативного пациента данной группы, имевшего двойственное развитие половых органов, отсутствие гена SRY обусловлено потерей дистальной части короткого плеча Y-хромосомы. Делеции длинного плеча Y-хромосомы, захватывающие эухроматин MSY региона (регионы AZFa, AZFb и/или AZFc), обнаружены у 64,5% пациентов группы. Среди выявленных в данной группе перестроек преобладали терминальные Yq и дисцентрики Yr с точками разрыва в Yq11.2 (преимущественно в области проксимальной границы AZFb региона), что привело к потере гетерохроматина Yq12 и большей части эухроматина MSY-региона длинного плеча Y-хромосомы, как правило, с захватом региона AZFb и/или AZFc. Не обнаружено достоверного различия в частоте полных AZF делеции у детей и взрослых пациентов мужского пола с мозаицизмом X/XY и его вариантам.

3.4. Цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с кариотипом 46,XX/46,XY.

Среди обследованных пациентов у 20 больных, при стандартном цитогенетическом и/или молекулярно-генетическом исследовании выявлен кариотип 46,XX/46,XY – редкий вариант аномалии в системе половых хромосом. Возраст больных составлял от 2 мес. до 28 лет, среди них 16 детей и 4 взрослых (табл. 17). У 10 индивидуумов фенотипический пол при рождении был определен как мужской, у 10 – женский. У двух больных впоследствии был изменен пол: с мужского на женский (пациент Х.Е.2), и с женского на мужской (пациент Ч.В.). Еще у одного больного (Б.Д./An16), имевшего двойственное развитие гениталий вопрос выбора пола еще не был решен окончательно и ему предстояла хирургическая коррекция.

Большинству пациентов цитогенетическое исследование было выполнено в связи с наличием нарушения формирования пола и/или задержкой полового и физического развития. Причиной обращения для медико-генетического обследования являлись первичным бесплодием в браке (пациент AZF57, имеющий мужской пол без признаков двойственности полового развития, но с наличием гипоплазии правого яичка), обнаружение злокачественной опухоли яичника (пациентка Ф.Н./An267), а также несоответствие результатов ПГД в программе ICSI фенотипу троих новорожденных sibсов (Табл. 17). За исключением данных трех индивидуумов (Г.А./An75, Г.Ф./An76 и Г.Р./An77), рожденных после применения ВРТ, пациенты данной группы не являлись родственниками.

У одного больного (SRY257) с кариотипом диагностирован синдром Протея, у другого (AZF1841) – подозрение на синдром Нунан отставание в росте, гипоплазия матки. Анализ гена *PTPN11* (локус 12q24.13), мутации которого обнаруживают примерно у 30-45% больных с синдромом Нунан не выявил наличия мутаций (данные не показаны).

Результаты повторного цитогенетического или комплексного генетического обследования, выполненного у 18 пациентов данной группы, свидетельствовали о неправильно первично определенном кариотипе у 8 индивидуумов (44,4%). В

четырёх случаях (SRY257, AZF1841, К.А. и К.В.), как было установлено, пациенты имели нормальный женский (46,XX) кариотип, и в четырёх случаях (SRY144, SRY75, Г.А./An75 и Ч.В.) с помощью молекулярно-генетического и/или молекулярно-цитогенетического анализов выявлен скрытый мозаицизм по хромосоме Y. У 1 из 13 (7,7%) XX/XY больных, у которых с помощью ПЦР подтверждено наличие последовательностей короткого и длинного плеча Y-хромосомы, обнаружено отсутствие гена *SRY* (табл. 17).

С учетом данных повторного обследования соотношение мужского, женского и двойственного фенотипов развития половых органов у 46,XX/46,XY пациентов было равным: 6:6:4. Распределение пациентов данной группы по полу, в том числе с учетом уточненного кариотипа, а также по преобладающему клону клеток приведены в таблицах 19 и 20, соответственно. Развитие половых органов по мужскому типу или двойственное (пол неопределённое), так называемый интерсексуальный типом развития гениталий, отмечен у 12 из 16 (75%) XX/XY-индивидуумов.

Результаты повторного цитогенетического или комплексного генетического обследования, выполненного у 18 пациентов данной группы, свидетельствовали о неправильно первично определенном кариотипе у 8 индивидуумов (44,4%). В четырёх случаях (SRY257, AZF1841, К.А. и К.В.), как было установлено, пациенты имели нормальный женский (46,XX) кариотип, и в четырёх случаях (SRY144, SRY75, Г.А./An75 и Ч.В.) с помощью молекулярно-генетического и/или молекулярно-цитогенетического анализов выявлен скрытый мозаицизм по хромосоме Y (табл. 18). У 1 из 13 (7,7%) XX/XY больных, у которых с помощью ПЦР подтверждено наличие последовательностей короткого и длинного плеча Y-хромосомы, обнаружено отсутствие гена *SRY* (табл. 17). Результаты картирования точки разрыва в Yp11, выполненное у данного пациента приведено в разделе 3.11.

Результаты обследования 20 пациентов с кариотипом 46,XX/46,XY.

№	Код пац.	Возраст	Пол	Диагноз	Фенотип	Оценка по Прадеру*	Кариотип по данным цитогенетического обследования, FISH/ДНК-анализа	SRY	AMELY	AZF
1	AZF57	29 лет	М	Гипергонадотронный гипогонадизм, аплазия гонады справа. Бесплодие I, олигоастенотерато-зооспермия III ст.	Мужской	P V	mos 46,XX[24]/46,XY[6]	+	+	+
2	SR Y75	3 г.	М	НФП, мошоночная форма гипоспадии. Аплазия левой почки	Двойственное развитие гениталий	P II	mos 46,XX/46,XY (первично кариотип – 46,XX)	+	+	+
3	SR Y158	2 мес.	М	НФП	Двойственное развитие гениталий	P III	mos 46,XX/46,XY	+	+	+
4	SR Y185	1,5 г.	Ж	НФП	Двойственное развитие гениталий	P II	mos 46,XX[70]/46,XY[30]	del	+	+
5	SR Y257	4 мес.	Ж	МВПР, синдром Протея, НФП, гипертрофия клитора	Женский с признаками маскулинизации	P I	mos 46,XX[14]/46,XY[6], повторно – 46,XX[30]	-	-	-
6	AZF184 1	10 лет	Ж	НФП. Синдром Нунан?	Женский. Отставание в росте, гипоплазия матки.	P 0	mos 46,XX/46,XY	-	-	-
7	X.E1	10 л.	М	НФП, дисгенезия тестикул, стволовая гипоспадия, отсутствие придатков яичка и семенных пузырьков	Двойственное развитие гениталий	P III	mos 46,XX[6]/46,XY[44]	+	+	+

№	Код пац.	Возраст	Пол	Диагноз	Фенотип	Оценка по Прадеру*	Кариотип по данным цитогенетического обследования, FISH/ДНК-анализа	SRY	AMELY	AZF
8	Ю.Р.	14 лет	М	Двусторонний крипторхизм. Задержка физического и полового развития	Мужской. Раннее закрытие зон роста 8 лет. Рост 139 см, вес 43 кг.	Р IV	mos 46,XX[49]/46,XY[1]	+	+	н.и.
9	Х.Е.2	11 лет	М (-> Ж)	НФП, тестикулярный дистенез, УГС, стволочная гипоспадия крипторхизм справа	Двойственное развитие гениталий	Р III	mos 46,XY[29]/46,XX[4]	+	+	*
10	К.В.	17 лет	Ж	НФП, дисгенезия гонад неполная форма. Опсоменорея	Женский, гипоплазия яичника слева	Р 0	mos 46,XX[95]/46,XY[5], повторно – 46,XX	-	-	-
11	SRУ 144	15 лет	Ж	НФП, аменорея I, гипергонадотропный гипогонадизм	Женский фенотип, дисгерминома, гонадобластома (?)	Р 0	mos 46,XX/46,XY (первичный кариотип – 46,XX)	+	+	+
12	Б.Д./ An16	2г.	М	НФП, овотестикулярная форма, промежуточная гипоспадия	Двойственное развитие гениталий	Р III	mos 46,XX[17]/46,XY[33]	+	+	+
13	Ф.Н./ An267	29 л	Ж	НФП, Смешанная герминогенная опухоль	Женский с признаками маскулинизации	Р I	mos 46,XX[47]/45,X[2]/46,XY[1] FISH: mos 46,XX(94%)/45,X(5%)/46,XY(1%)(лимф.); mos 46,XX(75%)/46,XY(25%)(букк. эп.)	+	+	+
14	Г.А./ An75	новорожденный	Ж	НПФ	Женский без признаков двойственности	Р 0	mos 46,XX[48]/46,XY[2] FISH: mos 46,XX(93%)/46,XY(7%)(лимф.) mos 46,XX(63%)/46,XY(37%)(букк. эп.)	+	+	+

№	Код пац.	Возраст	Пол	Диагноз	Фенотип	Оценка по Прадеру*	Кариотип по данным цитогенетического обследования, FISH/ДНК-анализа	SRY	AMELY	AZF
15	Г.Ф. / Ап76	новорожденный	М	НФП ?	Мужской	P V	46,XY, FISH: mos 46,XX(7%)/46,XY(93%) (лимф.)	+	+	+
16	Г.Р. / Ап77	новорожденный	М	НФП ?	Мужской	P V	mos 46,XX[1]/46,XY[29] FISH: mos 46,XX(4%)/46,XY(96%) (лимф.)	+	+	+
17	К.А.	31г.	Ж	Б1, аменорея	Женский без признаков двойственности	P 0	mos 46,XX[95]/46,XY[5], повторно - 46,XX[100]	Н.и.	Н.и.	Н.и.
18	У.А.	10 л.	М	НФП. Ожирение	Мужской	P V	mos 46,XY[45]/46,XX[6]/45,X[1]	Н.и.	Н.и.	Н.и.
19	Ч.В.	37 лет	Ж >М	НФП, двухсторонний крипторхизм, гипоспадия	Мужской с признаками дефицита маскулинизации	P IV	mos 46,XY[190]/46,XX[10] первичный кариотип – 46,XY	Н.и.	Н.и.	Н.и.
20	Р.В.	13 лет	Ж	Задержка роста и полового развития аменорея	Женский без признаков двойственности. Рост 133 см, вес 30 кг. Ма0P0Ax0Me0	P 0	mos 46,XX[27]/46,XY[2]	Н.и.	Н.и.	Н.и.

Примечание: Н.с. – нет сведений; * Степень маскулинизации наружных половых органов по Прадеру. *- исследовали ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови и гонад. Н.и. – не исследовали; лимф. – лимфоциты, букк. эп. – буккальный эпителий.

Среди XX/XY пациентов мужского пола или с двойственным развитием гениталий наличие Y-хромосомы в кариотипе было подтверждено во всех случаях. В отличие от них среди больных с развитием половых органов по женскому типу, у 4 из 8 (50%) пациенток с помощью молекулярно-генетического и/или повторного цитогенетического исследования не было обнаружено наличия Y-хромосомы в лимфоцитах периферической крови. Следует отметить, что у всех 4 пациенток с Y+ гоносомным мозаицизмом клон 46,XX был преобладающим, а клон, несущий Y-хромосому – минорным, причем при стандартном цитогенетическом исследовании он был обнаружен у 3 больных (пациентка Ф.Н./An267, новорожденная Г.А. из тройни и пациентка Р.В., у которой повторного исследования не выполняли), у четвертой мозаицизм по Y был скрытым, и выявлен только с помощью ПЦР (пациент SRY144).

У 3 из 20 (15%) пациентов данной группы помимо нарушений репродуктивной системы отмечено поражение других органов или систем. Как было установлено в ходе повторного генетического обследования, два из них не были мозаиками 46,XX/46,XY. У больного SRY257 диагностировали синдром Протея, у другого пациента (AZF1841) с отставанием в росте и гипоплазией матки – подозрение на синдром Нунан. Анализ гена *PTPN11* (локус 12q24.13), мутации которого обнаруживают примерно у 30-45% больных с синдромом Нунан, не выявил наличия мутаций (данные не показаны). У третьего больного (SRY75) с наличием экстрагенитальных поражений выявлена аплазия почки слева. Помимо этого, у него отмечали двойственность в развитие гениталий (мошоночная форма гипоспадии, расщепленная мошонка). Изначально диагноз у данного больного был определен как 46,XX-инверсия пола, так как первичный кариотип был определен как 46,XX, однако повторное цитогенетическое исследование свидетельствовало о наличии Y-хромосомы – повторный кариотип 46,XX/46,XY. Наличие яичек в мошонке было обнаружено данными УЗИ. Результаты молекулярно-генетического анализа подтвердили наличие всех исследованных последовательностей Y-хромосомы в крови пациента (табл. 17).

Молекулярный анализ Y-хромосомы выполнен у 16 индивидуумов данной группы (табл. 17). У трех пациентов все анализируемые локусы короткого и длинного плеча Y не обнаружены, что свидетельствовало об отсутствии материала

Y-хромосомы. У одного больного (SRY185) обнаружено отсутствие локуса *SRY* при наличии локусов *AMELY* и маркеров длинного плеча Y-хромосомы, что свидетельствовало об наличие перестроенной хромосомы Y, очевидно, возникшей в результате X;Y транслокации. Результаты картирования точки разрыва в Yp11, выполненного у данного пациента, приведены в разделе 3.11. У остальных (Y+) пациентов отмечали амплификацию всех исследованных маркеров Y-хромосомы. При этом у 5 пациентов *SRY+* XX/XY больных исследовали не только лимфоциты, но и другие ткани (буккальный эпителий или биоптат гонад). Во всех случаях также отмечали положительную амплификацию ДНК проанализированных маркеров во всех проанализированных образцах. Микроделеции длинного плеча Y-хромосомы не обнаружены ни у одного пациента данной группы, которым выполнено исследование маркеров локуса *AZF*, включая пациента *AZF57* – мужчины с первичным бесплодием, имевшего гипоплазию правого яичка, гипогонадизм и олигозооспермию тяжелой степени (табл. 17).

С учетом данных повторного обследования соотношение мужского, женского и двойственного фенотипов развития половых органов у 46,XX/46,XY пациентов было равным: 6:6:4. Распределение пациентов данной группы по полу, в том числе с учетом уточненного кариотипа, а также по преобладающему клону клеток приведены в таблицах 18 и 19, соответственно.

Таблица 18

Распределение фенотипов по соматическому (анатомическому) полу у 20 пациентов с кариотипом 46,XX/46,XY.

Мужской пол (n=6)		Двойственное развитие гениталий (n=6)	Женский пол (n=8)	
Без дефицита маскулинизации	С дефицитом маскулинизации		Без маскулинизации	С маскулинизацией
3	3	6	6	2
3*	3*	6*	3*	1*

Примечание: *- с учетом исключения 4 неправильно идентифицированных случаев.

Развитие половых органов по мужскому типу или двойственное (пол неопределённое), так называемый интерсексуальный типом развития гениталий, отмечен у 12 из 16 (75%) XX/XY-индивидуумов. Среди данных пациентов наблюдали равное соотношение случаев с доминированием клеточных линий

(клонов), имеющих кариотип 46,XY и 46,XX (табл. 19).

Таблица 19

Распределение по полу у 16 пациентов с подтвержденным кариотипом 46,XX/46,XY в зависимости от преобладания клеточных линий (клонов).

Мужской пол (n=6)	Двойственное развитие гениталий (n=6)	Женский пол (n=4)
46,XY>46,XX (n=4)	46,XX >46,XY(n=3)	46,XX >46,XY(n=4)
46,XX >46,XY(n=2)	46,XY>46,XX (n=3)	46,XY>46,XX (n=0)

Ниже приведены 2 наиболее показательных клинических случая из данной группы пациентов: низкопроцентный мозаицизм по Y-хромосоме у фертильной женщины и химеризм XX/XY у пациента с двойственным развитием гениталий.

Клинический случай 3.

Пациентка Ф.Н. (An267), 29 лет направлена для цитогенетического обследования и медико-генетического консультирования по поводу смешанной герминогенной опухоли яичников. Из данных анамнеза – у пациентки с рождения поставлен диагноз «ВДКН вирильная форма, дефицит 21-гидроксилазы, по поводу которого, она с детства наблюдается и лечится у эндокринолога.

Диагноз ВДКН был поставлен на основании аномально развития гениталий (гипертрофия клитора), повышенного уровня 17-ОНП, положительную динамику на заместительной гормонотерапии препаратами гормонов надпочечников. В последствие у пациентки в возрасте 17 лет проведено молекулярно-генетическое исследование – поиск мутаций в гене CYP21B, кодирующем 21-гидроксилазу, обнаружена гетерозиготная мутация V281L, специфичная для вирильной формы ВДКН. Цитогенетическое обследование ранее не проводили. Наследственность в семье неотягощена. Родная сестра - 36 лет, здорова, имеет здорового сына.

Развитие пациентки по возрасту, менструальная функция с 13,5 лет на фоне гормональной терапии. В возрасте 23 лет пациентка вышла замуж и после 3-4 месяцев половой жизни без предохранения забеременела. Беременность закончилась родами путем кесарева сечения, родился здоровый мальчик, его физическое и умственное развитие соответствует возрасту. Впоследствии

пациентка обращалась к гинекологу по поводу кист яичников. В возрасте 28 лет при лапароскопическом удалении кист была обнаружена опухоль правого яичника, по данным гистологического исследования смешанная дисгерминома. Пациентке выполнено удаление придатков матки справа (I этап оперативного лечения).

Данные объективного обследования: пациентка феминного телосложения, умеренного питания, вес – 50 кг, рост 161 см. Признаков асимметрии развития не отмечено. Живот мягкий, пальпаторно безболезненный.

Status genitalis: лобковое оволосение и развитие наружных половых органов по женскому типу. Состояние после хирургической пластики клитора.

Данные гинекологического осмотра (до экстирпации матки): шейка матки в зеркалах цилиндрической формы, несколько укорочена, с неизменной слизистой. Наружный зев точечный, выделений нет. Тело матки не увеличено, область придатков без особенностей, придатки справа удалены хирургическим путем, пальпаторно безболезненные. Параметрии свободные, своды глубокие.

В связи с наличием злокачественной опухоли гонад и обнаружения мозаицизма по хромосоме Y пациентке проведено II этап оперативного лечения – лапароскопическая экстирпация матки с левыми придатками. По данным УЗИ органов брюшной полости и малого таза (после операции) без признаков патологии.

Данные гистологического исследования: макропрепарат – матка с левыми придатками, удаленная на уровне наружного зева. Слизистые оболочки шейки матки и цервикального канала гладкие. Эндометрий рыхлый, серо-красный, толщиной до 0,2 см². Левая маточная труба обычного вида, левый яичник 3×2,5×2см, мягкий, на разрезах представлен мягкой белесовато-розовой тканью, участками ярко-желтого цвета (желтые тела) и участками темно-красного цвета. Яичник полностью взят для исследования. Большой сальник 30×8×1см, представлен жировой тканью, без уплотнений. Описание микропрепаратов: 1 – шейка матки и цервикальный канал обычного строения, эндометрий секреторного типа; 2 – маточная труба, обычного строения, в яичнике – желтые тела, киста желтого тела, примордиальные фолликулы. Элементов опухоли не найдено. Большой сальник без опухолевого роста.

Результаты медико-генетического обследования:

При анализе кариотипа по лимфоцитам периферической крови обнаружен низкопроцентный сложный мозаицизм по половым хромосомам – кариотип mos 46,XX[47]/45,X[2]/46,XY[1]. Результаты интерфазного FISH анализа с пробами на центромерные области хромосом X и Y выявили мозаицизм: в лимфоцитах – *pus ish (DXZ1×1)[10]/(DXZ1,SR Y×1)[2]/ (DXZ1×2)[188]*, и в буккальном эпителии – *pus ish DXZ1,SR Y×1)[25]/(DXZ1×2)[75]*, т.е. обнаружен гоносомный мозаицизм с клеточными клонами 45,X (5% и 0%), 46,XX(94% и 75%), 46,XY (1% и 25%), соответственно.

Результаты мПЦР с праймерами для 18 Yq STSs-маркеров не выявили наличия микроделечий Y-хромосомы в локусе AZF и свидетельствовали о присутствии генов короткого плеча Y-хромосомы: локусы *SRY* и *ZFY* (данные не показаны). КФ-ПЦР анализ, проведенный для хромосом 13, 18, 21, X и Y, не выявил наличия трисомии по аутосомам (13, 18, 21), химеризма, и подтвердил наличие минорного (около 5%) мозаицизма по хромосоме Y как в лимфоцитах периферической крови, так и буккальном эпителии. Результаты КФ-ПЦР пациентки Ф.Н. приведены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты КФ-ПЦР у пациентки Ф.Н. (An267).

Маркер	D13S634	D13S305	D13S800	D13S628	D13S252
Результат	N	N	N	N	N
Маркер	D18S535	D18S386	D18S978	D18S390	D18S819
Результат	Н.и.	N	N	N	N
Маркер	D21S1435	D21S11	D21S1446	D21S1409	D21S1442
Результат	N	N	N	N	N
Маркер	Amelogenin	4SH	ZFX/ZFY	TAFL	SRY
Результат	Неравное соотношение X и Y			2 хромосомы X	+
Маркер	DXS6803	DXS9896	DXS1187	XHPRT	DXS8378
Результат	2 аллеля	2 аллеля	1 аллель	1 аллель	2 аллеля

Примечания: N – норма. Н.и. – не информативен.

Данный случай является уникальным, так как в литературе описаны единичные случаи сохранения фертильности у SRY+ (Y-позитивных) женщин. До удаления матки и с придатками у пациентки была сохранена фертильность и

беременность наступила естественным путем, при наличии мозаицизма по хромосоме Y, в том числе присутствующего в гонадах, приведшего к нарушению их развития.

Согласно данным комплексного генетического обследования, диагноз у пациентки Ф.Н. (An267) был пересмотрен. Окончательный диагноз изменен на: Гоносомно-обусловленное нарушение формирование пола, мозаицизм 46,XX/46,XY, дисгенезия гонад, ассиметричная форма, смешанная герминогенная опухоль правого яичника, состояние после оперативного удаления придатков матки справа. Диагноз ВДКН вследствие дефицита 21-гидроксилазы и соответствующая гормональная терапия у пациентки были сняты. В настоящее время решается вопрос о заместительной гормонотерапии препаратами женских половых гормонов.

Клинический случай 4.

Пациент Б.Д. (An16), 2 года направлен в МГНЦ РАМН для медико-генетического обследования и консультирования по поводу аномального строения наружных половых органов. Ребенок родился от первой доношенной беременности, протекавшей без осложнений. Вес – 3530 г, рост – 53 см. При рождении отмечено неправильное развитие наружных половых органов. Паспортный пол пациенту был определен как мужской, воспитание в мужском поле. Раннее развитие больного без особенностей.

Данные объективного обследования: пациент правильного телосложения, показатели физического и умственного развития соответствуют возрасту. Пороков развития помимо нарушения развития гениталий не отмечено.

Status genitalis: неопределенное по полу развитие наружных половых органов (промежностная гипоспадия, расщепленная мошонка, пенисообразный клитор - клиторофаллос).

Гистологическое картина биоптатов свидетельствовала о наличие у больного овотестикулярной формы НПФ – овотестис с обеих сторон (данные не приведены).

Данные медико-генетического обследования:

При стандартном цитогенетическом исследовании кариотип пациента mos 46,XX[17]/46,XY[33]. Родители пробанда здоровы, не являются родственниками.

Кариотипы родителей нормальные (мать – 46,XX, отец – 46,XY). Пробанду и его матери (биологический материал от отца был недоступен для исследования) проведено молекулярно-генетическое исследование на ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови. Мультиплексная ПЦР с праймерами для 18 Yq STSs-маркеров не обнаружила наличие микроделечий Y-хромосомы в локусе AZF. Методом количественной флюоресцентной ПЦР выявлено изменение количественного соотношения аллелей (маркеры D18S386, D18S390, D18S819), а также выявлено 3 аллеля по маркеру D18S978. Анализ 7 следующих локусов (маркеров): *SRY*, *AMELX/AMELY*, *ZFX/ZFY*, *4SH* и *TAFL*, свидетельствовал о наличии в геноме всех исследованных локусов, в том числе гена *SRY*, и подтвердил измененное соотношение клеточных клонов по половым хромосомам. Выявлено нарушение соотношения числа хромосом X и Y с наличием клона с двумя хромосомами X (по маркерам DXS6803, DXS9896, DXS1187, XHPRT), доля которого составила около 30% (табл. 21). Таким образом, установлено, что у данного пациента присутствует химеризм с присутствием двух XX- и XY-несущих клонов, оценив его примерно как 46,XX(30%)/46,XY(70%).

Таблица 21

Результаты КФ-ПЦР у пациента Б.Д. (An16).

Маркер	D13S634	D13S305	D13S800	D13S628	D13S252
Результат	N	N	N	Н.и.	N
Маркер	D18S535	D18S386	D18S978	D18S390	D18S819
Результат	N	2:1	3 аллеля	2:3	3:1
Маркер	D21S1435	D21S11	D21S1446	D21S1409	D21S1442
Результат	N	N	N	Н.и.	Н.и.
Маркер	AMEX/Y	4SH	TAFL	ZFX/Y	SRY
Результат	X, Y	X, Y	2:3	X, Y	+
Маркер	DXS6803	DXS9896	DXS1187	XHPRT	
Результат	2 аллеля	2 аллеля	2 аллеля	2 аллеля	

Примечание: N – норма. Н.и. – не информативен.

Исследование происхождения кариотипа 46,XX/46,XY (вследствие гоносомного мозаицизма или химеризма) выполнено у 5 пациентов: Б.Д., Ф.Н и 3 сибсов семьи Г. (табл. 22). Для этого использовали метод количественной

флуоресцентной полимеразной цепной реакции и молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH-анализ), исследуя лимфоциты периферической крови и клетки буккального эпителия. Результаты КФ-ПЦР у пациентки Ф.Н./An267 отражены в таблице 21, больного Б.Д./An16 – в таблице 21 в рисунке 29, а тройни новорожденных Г. (Г.А./An75, Г.Ф./An76 и Г.Р./An77) – в рисунках 30-33.

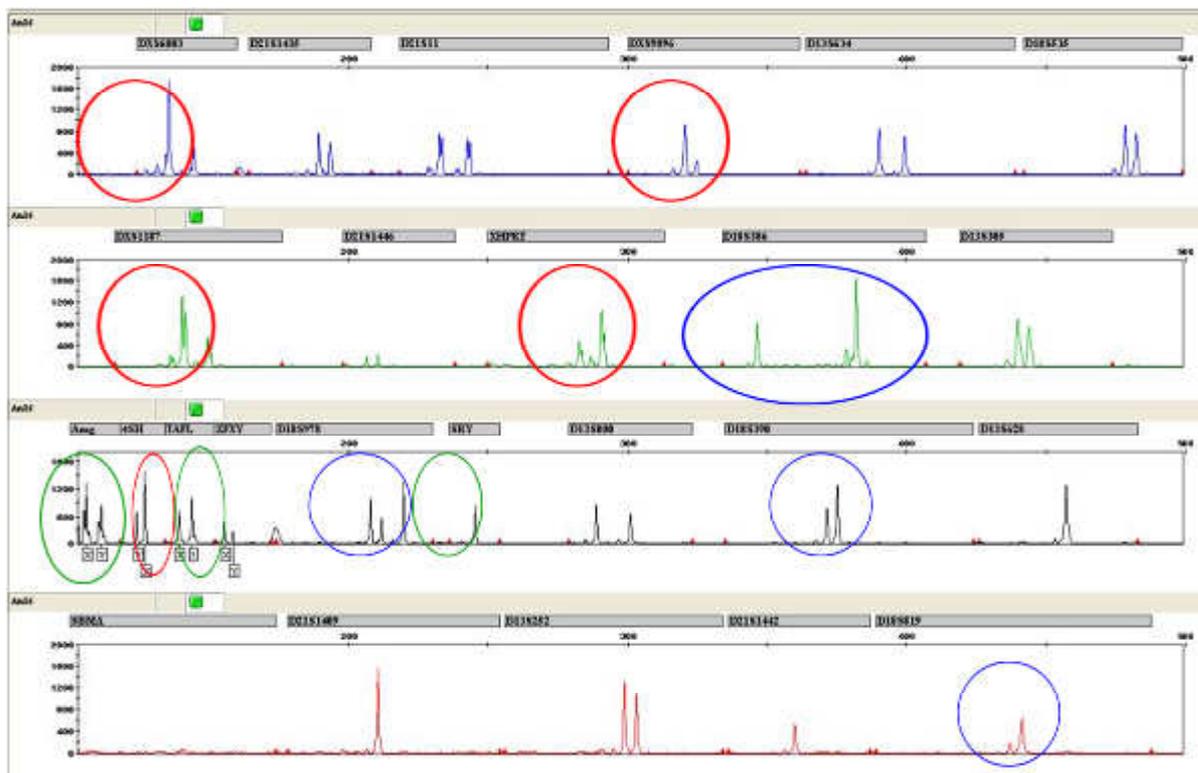


Рис. 29. Результаты КФ-ПЦР у пациента Б.Д. (An16) с кариотипом 46,XX/46,XY. Примечание: Красными и зелеными эллипсами, соответственно, обведены маркеры хромосом X и Y, представленные в геноме в 1 или 2 копиях; синими – аутосомные маркеры, представленные в 3 копиях.

Наличие истинного химеризма установлено, по крайней мере, у пациентов: Б.Д. (An16) и Г.А. (An75) Результаты КФ-ПЦР анализа, проведенного у них подтвердили наличие гоносомного мозаицизма и не выявили наличия трисомии по аутосомам (13, 18, 21) и хромосомам X, Y, при этом обнаружено изменение в соотношении количества хромосом X и Y с наличием клона с двумя хромосомами X и клона с набором XY и наличием 3 аллелей для некоторых из исследованных хромосом или измененного соотношения некоторых аллелей.

У пациента Б.Д./An16 наличие химеризма установлено по исследованию лимфоцитов периферической крови, а у пациента Г.А. по результатам

исследования, как лимфоцитов периферической крови и клеток буккального эпителия.

Пациент Г.А. (An75) являлась новорожденной девочкой из тройни (два ее брата Г.Ф./An76 и Г.Р./An77), родившейся после проведения экстракорпорального оплодотворения методом ICSI. Их родители – супружеская пара обратилась для проведения ЭКО по поводу вторичного бесплодия, у которой имеется 2 здоровых детей (19 и 17 лет) и случай замершей беременности в анамнезе.

Учитывая поздний репродуктивный возраст у супруги (42 года) и наличие самопроизвольного прерывания беременности проведена преимплантационная генетическая диагностика, ПГД – скрининг на частые анеуплоидии (по хромосомам 13, 18, 21, X и Y). По результатам ПГД было отобрано для переноса 3 эмбриона без анеуплоидий по исследованным хромосомам (2 – с набором гоносом XX и 1 – с набором XY). При рождении отмечено, что двое детей (Г.Р. и Г.Ф.) из тройни имели развитие половых органов по мужскому типу (отнесены к мужскому полу), а один ребенок (Г.А.) – гениталии, развитые по женскому типу (отнесен к женскому полу). Результаты генетического обследования тройни Г., а также рпациентов Ф.Н. и Б.Д. суммаризированы в таблице 22.

По данным молекулярно-генетического анализа установлено, что все трое новорожденных Г. являются близнецами, при этом по лимфоцитам периферической крови они выглядели как монозиготные близнецы, но при исследовании буккального эпителия пациента Г.А./An76 (новорожденной девочки с внешне нормальным фенотипом) обнаружено явное различие по аллелям, обнаруженным в лимфоцитах, что свидетельствовало о наличие у нее химеризма с принципиально различающимися клеточными клонами в крови и буккальном эпителии (рис. 30-33).

Согласно результатам, полученным с помощью цитогенетического и молекулярно-генетического исследования, а также анамнестических данных, нами создана схема развития перенесенных эмбрионов, полученных после ICSI и отобранных после ПГД, а также механизм возникновения химеризма у пациента Г.А. путем слияния двух эмбрионов XX и XY (рис. 34).

Результаты молекулярно-генетического обследования у 5 пациентов, обследованных на химеризм.

Пациент	Кариотип (лимфоциты периферической крови)	Результаты FISH-анализа			Результаты КФ-ПЦР по детекции химеризма	
		Лимфоциты периферической крови	Буккальный эпителий	Лимфоциты периферической крови	Буккальный эпителий	
Б.Д., An 16	mos 46,XX[17]/46,XY[33]	mos 46,XX(30%)/46,XY(70%)	н.и.	обнаружен	н.и.	
Ф.Н., An267	mos 46,XX[49]/46,XY[1]	mos 46,XX(94%)/45,X(5%)/46,XY(1%)	mos 46,XX(75%)/46,XY(25%)	не обнаружен	не обнаружен	
Г.1 (Г.А.)	46,XY	mos 46,XX(7%)/46,XY(93%)	н.и.	не обнаружен*	не обнаружен	
Г.2 (Г.Ф.)	mos 46,XX[48]/ 46,XY[2]	mos 46,XX(93%)/46,XY(7%)	mos 46,XX(63%)/46,XY(37%)	не обнаружен	обнаружен	
Г.3	46,XY	mos 46,XX(4%)/46,XY(96%)	н.и.	не обнаружен*	не обнаружен	

Примечание: *нельзя исключить микрохимеризм вследствие общего фето-плацентарного кровотока. Н.и. – не исследовали.

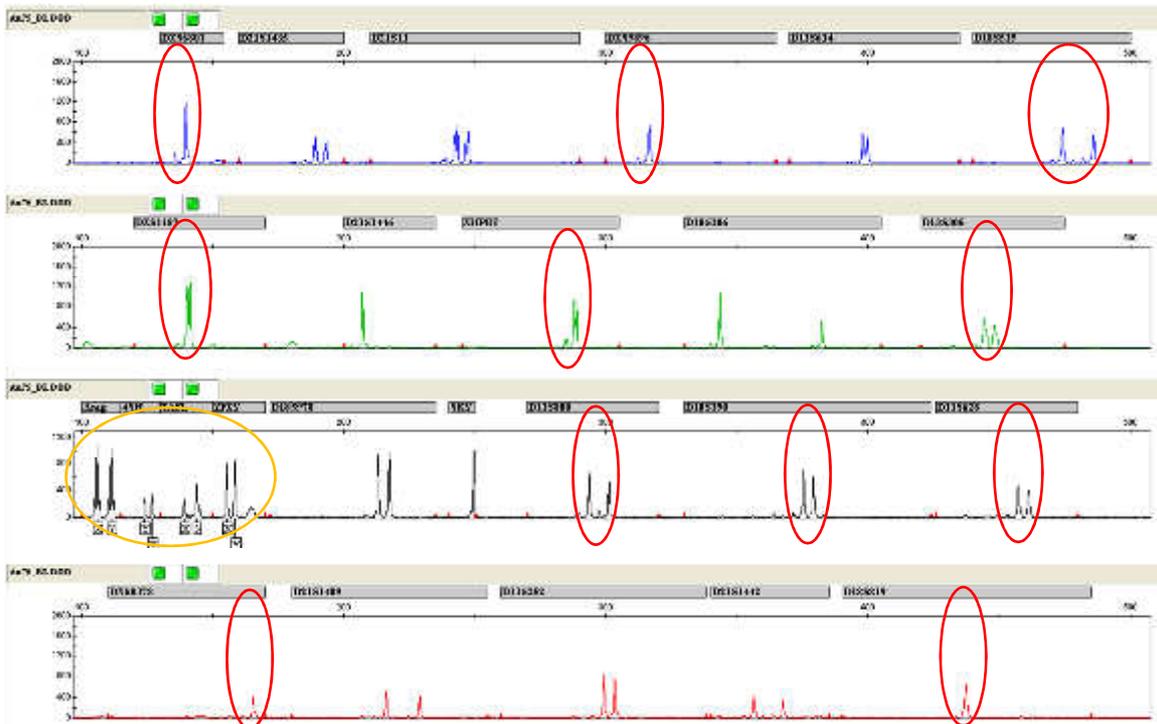


Рис. 30. Результаты КФ-ПЦР у пациента Г.А./An75 (лимфоциты).

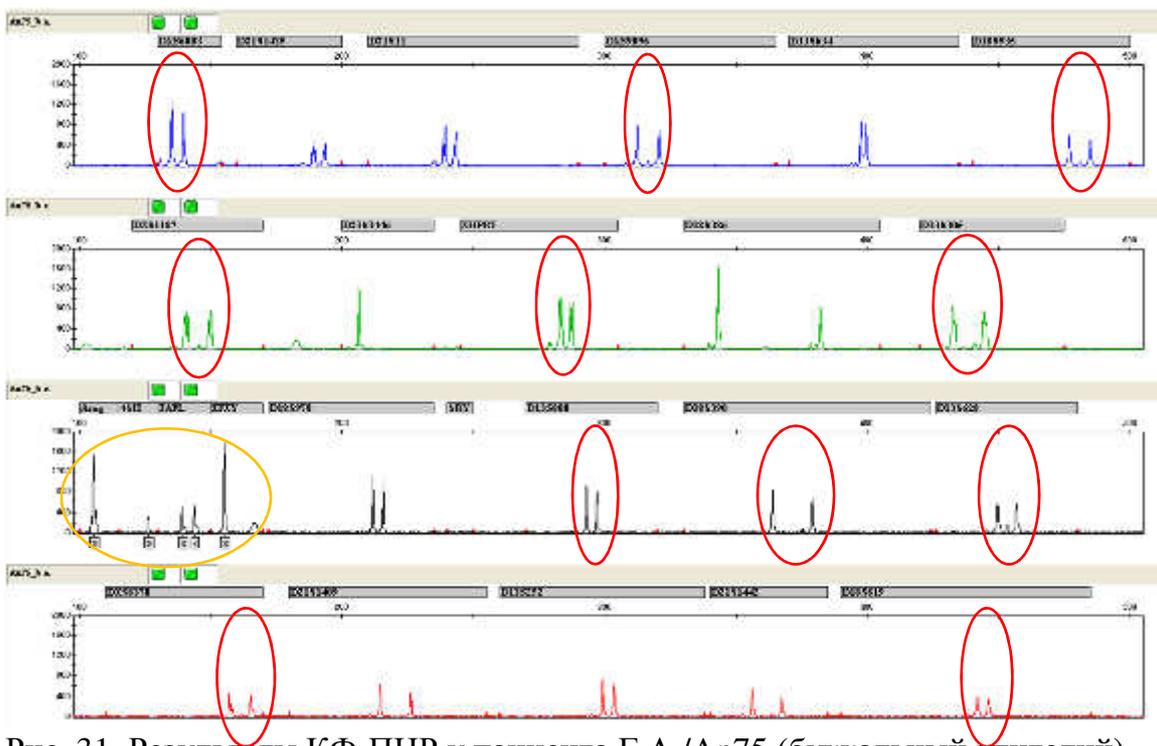


Рис. 31. Результаты КФ-ПЦР у пациента Г.А./An75 (буккальный эпителий).

Примечание: Красными эллипсами обведены несовпадающие аллели аутосом и хромосомы X, желтыми – локусы хромосом X и Y, по которым определяют количество, соотношение половых хромосом. Наглядно видно несоответствие генотипов, установленных при исследовании лимфоцитов периферической крови и клеток буккального эпителия.

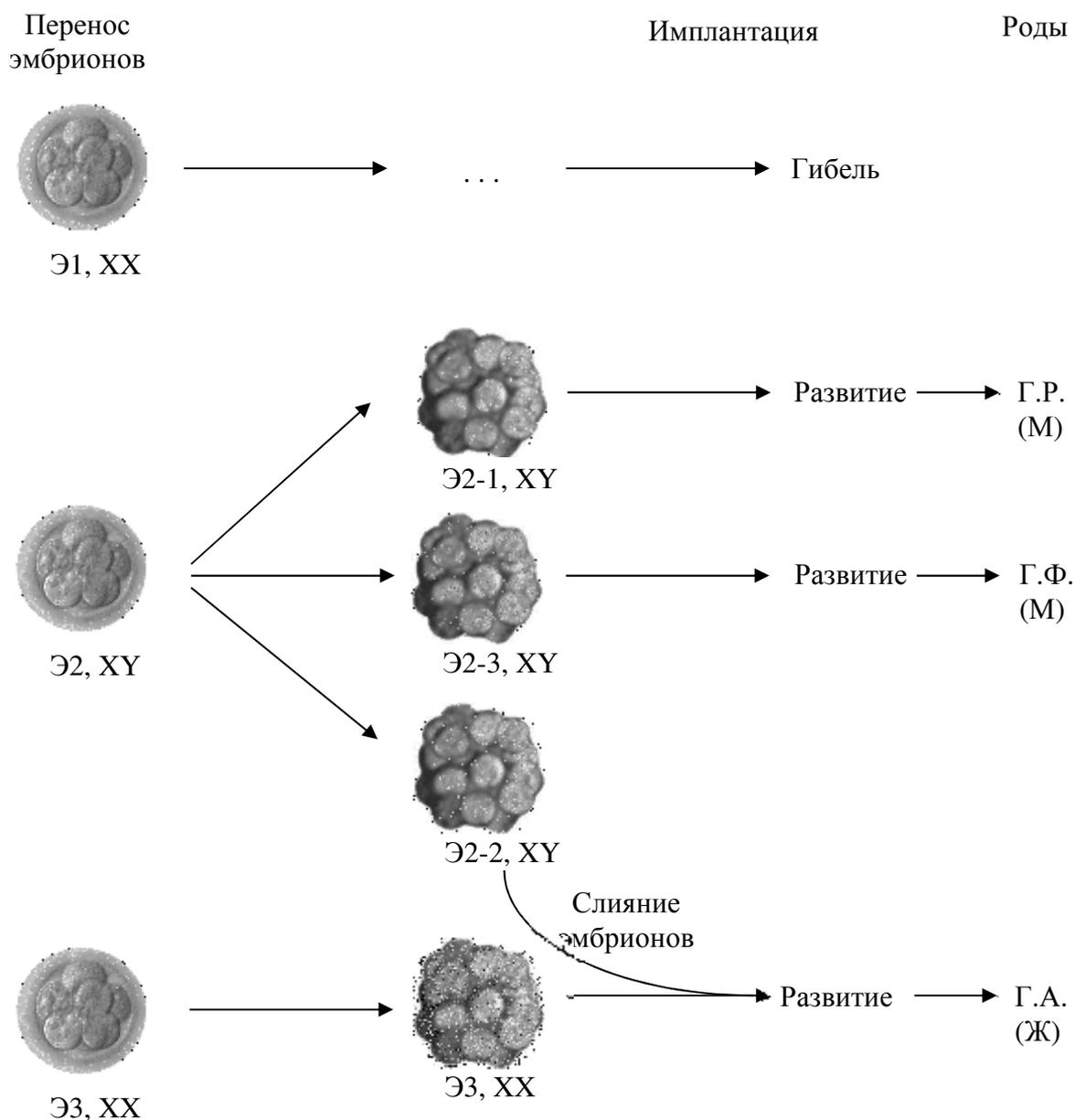


Рис. 34. Схема предполагаемого механизма возникновения химеризма у пациента Г.А. (An75) из тройни (Г.А, Г.Р, Г.Ф), родившейся после программы ЭКО/ICSI с проведением преимплантационной генетической диагностики (ПГД) на частые анеуплоидии. Генотип эмбрионов указан только набором половых хромосом (XX или XY).

Из 10 эмбрионов, полученных с помощью процедуры ЭКО/ICSI, после проведения преимплантационной генетической диагностики (ПГД) на частые анеуплоидии (по хромосомам 13, 18, 21, X, Y) для переноса было отобрано 3 эуплоидных эмбриона (Э1, XX ; Э2, XY и Э3, XX). Так как оплодотворение проводили методом ICSI, все три данных эмбриона не являлись монозиготными. В

дальнейшем эмбрион Э1, вероятно, перестал развиваться и погиб вскоре после переноса. Эмбрион Э2, вероятно, разделился на три части (Э2-1, Э2-2 и Э2-3), все из которых имели XY набор гоносом. Э2-1 и Э2-3 развились самостоятельно в плоды мужского пола, впоследствии ставшие Г.Р. и Г.Ф., а Э2-2 (XY), слился с Э3 (XX), что и привело к возникновению химеры 46,XX/46,XY (Г.А.). Возможно, что разделению Э2 и слиянию Э2-2 и Э3, способствовало выполнение хетчинга при биопсии бластомеров, что нарушает целостность оболочки эмбриона. Перенос более 1 эмбриона выполняют для увеличения вероятности наступления беременности, однако при переносе 2-3 эмбрионов (редко переносят большее число) значительно увеличивается вероятность многоплодной беременности dizygотными близнецами. Некоторые авторы свидетельствуют о повышенной по сравнению с естественным оплодотворением частоте монозиготных и dizygотных близнецов, а также химеризма после проведения ЭКО/ICSI [Miura, Niikawa, 2005; Ekelund et al., 2008].

У пациентов Г.Ф./An76 и Г.Р./An77 не удалось обнаружить химеризм, однако нельзя исключить у них наличия микрохимеризма из-за фетоплацентарного кровотока и попадания в их кровотоки клеток от плода Г.А./An75. Выявленный у новорожденных Г. гоносомный мозаицизм (46,XX/46,XY) с низкопроцентным уровнем клеточного клона 46,XX мог быть вследствие нерасхождения половых хромосом, возможно вследствие феномена «восстановления из трисомии» ('trisomy rescue').

Таким образом, в группе пациентов, у которых первоначально или в ходе обследования кариотип был определен как 46,XX/46,XY, выявлена значительная доля (40%) несоответствия результатов первичного цитогенетического исследования и результатов повторного/комплексного молекулярного и/или цитогенетического исследования. В равном количестве выявлены как случаи ложноположительной цитогенетической диагностики, так и ложноотрицательной диагностики данной аномалии гоносом при использовании только стандартного цитогенетического исследования, в частности случаев, обусловленных низкоуровневым гоносомным мозаицизмом с наличием несущих и не несущих Y-хромосому клеточных линий (XX и XY). Наличие данных клонов в кариотипе установлено с помощью молекулярно-цитогенетического исследования

(FISH анализ) и молекулярно-генетического исследования (КФ-ПЦР). У пациенток с Y+ гоносомным мозаицизмом клон 46,XX был преобладающим, а клон, несущий Y-хромосому – минорным. Делеция локуса SRY при наличии последовательностей локусов AMELY и маркеров длинного плеча Y-хромосомы выявлена у 1 из 16 (6,25%) XX/XU пациентов. Среди пациентов, у которых было подтверждено наличие Y-хромосомы, в том числе у пациента с делецией гена SRY, микроделеций AZF не было обнаружено. Показана гетерогенность происхождения кариотипа 46,XX/46,XU, возникновение его в результате мозаицизма по половым хромосомам (n=3) или истинного химеризма (n=2). Генитальный фенотип пациентов с подтвержденным кариотипом 46,XX/46,XU варьировал от мужского до женского, при этом соотношение мужского, двойственного и женского развития гениталий равнялось 6:6:4.

3.5. Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с “чистой” формой XY-дисгенезии гонад.

Среди обследованных нами пациентов было 66 больных с женским фенотипом (и зарегистрированных в женском поле) и дисгенезией гонад при наличии Y-хромосомы в кариотипе, не имеющих СШТ или других синдромов, связанных с анеуплоидией гоносом. Возраст пациентов варьировал от 1 года 17 лет (дети) и от 18 до 39 лет (взрослые), при этом 62% больных имели возраст от 12 до 19 лет.

Основными причинами обращения у взрослых пациентов и девушек-подростков являлась первичная аменорея, задержка полового созревания/половой инфантилизм. Наличие гонадобластомы и/или дисгерминомы обнаружено у 17 (25,8%) больных.

По данным первичного цитогенетического обследования нормальный мужской кариотип 46,XY установлен у 63 больных, у 3 обнаружены аномалии половых хромосом (наличие структурной перестройки – $der(Y)$, или трисомии по гоносомам: кариотипы 47,XXY, 47,XY₂ (табл. 23).

У одной пациентки с первичным кариотипом 46,XY и вторичной аменореей, повторное цитогенетическое исследование и молекулярно-генетическое исследование и ПЦР-анализ локусов короткого плеча (*SRY*, *ZFY*, *AMELY*) и длинного плеча (STS-маркеры регионов AZFa,b,c) хромосомы Y, выполненные на лимфоцитах периферической крови, свидетельствовали о неправильно определенном кариотипе при первичном цитогенетическом исследовании. Так как установлено, данная пациентка имела нормальный женский кариотип (46,XX), поэтому ее не рассматривали далее как больную с XY-дисгенезией гонад. У другой пациентки с первичным кариотипом определенным как 46,XY, повторное цитогенетическое исследование выявило наличие мозаицизма по изодицентрической хромосоме Y по короткому плечу – 45,X/46,X,idic(Y)(q11.2).

Результаты FISH анализа, выполненного у больной с Y-дериватом и 47,XXY-пациентки, позволили в первом случае установить тип перестройки – изодицентрическая Y-хромосома по длинному плечу, а во втором – выявить скрытый гоносомный мозаицизм (табл. 23).

Таблица 23

Результаты цитогенетического и молекулярного обследования 66 пациентов женского пола с XY-дисгенезией гонад.

Кариотип (по данным цитогенетического исследования); количество пациентов, n	Наличие гонадобластомы/ дисгерминомы	Повторный кариотип, результаты FISH анализа	Результаты ПЦР анализа			
			SRY	AMELY	AMELX	AZF
46,XY (первичный); n=1	-	46,XX	-	-	+	-
46,XY; n=2	-	Н.и.	-	+	+	+
46,XY; n=3	3	Н.и.	-	+	+	+
46,XY; n=56	14	Н.и.	+	+	+	+
46,XY (первичный); n=1	-	mos45,X[11]/46,X,idelic(Y)(q11.2)[19]	+	+	+	+
46,X,der(Y); n=1	-	ish idic(Y)(p11.2)(DXZ1x1, DYZ3x2)[30]	-	-	+	+
47,XY; n=1	-	Н.и.	Н.и.	Н.и.	Н.и.	Н.и.
47,XXY; n=1	-	nuc ish(DXZ1x2, DYZ3x1)[504]/ (DXZ1x1, DYZ3x1)[10]	-	+	+	+

Примечание: Н.и. – не исследовали.

С целью определения частоты встречаемости перестроек Y-хромосомы с потерей его материала в группе пациенток причин XY-дисгенезии гонад проведен ПЦР анализ гена *SRY* и других Y-специфичных локусов. Исследована ДНК, выделенная из лимфоцитов крови (n=57), а у 10 пациентов – также из ДНК, выделенной из биоптатов гонад (табл. 23). Молекулярно-генетический анализ Y-хромосомы не выполнен только у пациентки с кариотипом 47,XY_Y из-за недоступности биологического материала. Отсутствие Y-специфичных последовательностей обнаружено у пациентки с повторным кариотипом 46,XX, у которой первично кариотип установлен как 46,XY (табл. 23).

Отсутствие гена *SRY* (локус Yq11.3) обнаружено у 7 из 65 (10,8%) обследованных Y-позитивных больных данной группы, в том числе у 5 больных с кариотипом 46,XY, женщины с кариотипом 47,XXY, а также пациентки с изодицентрической Yq хромосомой. У последней, выявленная потеря последовательностей *SRY* и *AMELY* обусловлена самой перестройкой и расположением точек разрыва проксимальной части короткого плеча Y-хромосомы. Во всех 6 остальных случаях обнаружено наличие последовательности *AMELY* (локус Yp11.2), а также последовательностей длинного плеча Y-хромосомы. Следует отметить, что в 1 из 6 случаев имела место частичная делеция 3'района гена *SRY* (пациент SRY268).

Выявленные делеции MSY-региона, вероятно, обусловлены его потерей дистальной части Yp11 и ее замещением дистальной частью Xp22 на дериватной Y-хромосоме, der(Y), образовавшейся вследствие Xp;Yp транслокации (рис. 35). Вследствие того, что бэндинг перестроенной Y-хромосомы не нарушается, а ее изменения размера находятся за пределом разрешающей способности стандартного цитогенетического исследования данная перестройка не может быть идентифицирована при анализе кариотипа.

Результаты картирования точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы у XY-пациенток с делециями гена *SRY* приведены в разделе 3.11.

Кроме молекулярно-генетического исследования на наличие последовательности *SRY* у 12 пациентов с нарушением формирования пола (5 пациентов с полной формой дисгенезии гонад, 6 пациентов с неполной формой дисгенезии гонад/смешанной дисгенезией гонад, а также у 1 пациента с крайне

редкой аномалией развития мужских гениталий – афалией) выполнено секвенирование кодирующей последовательности гена *SRY* (табл. 24).

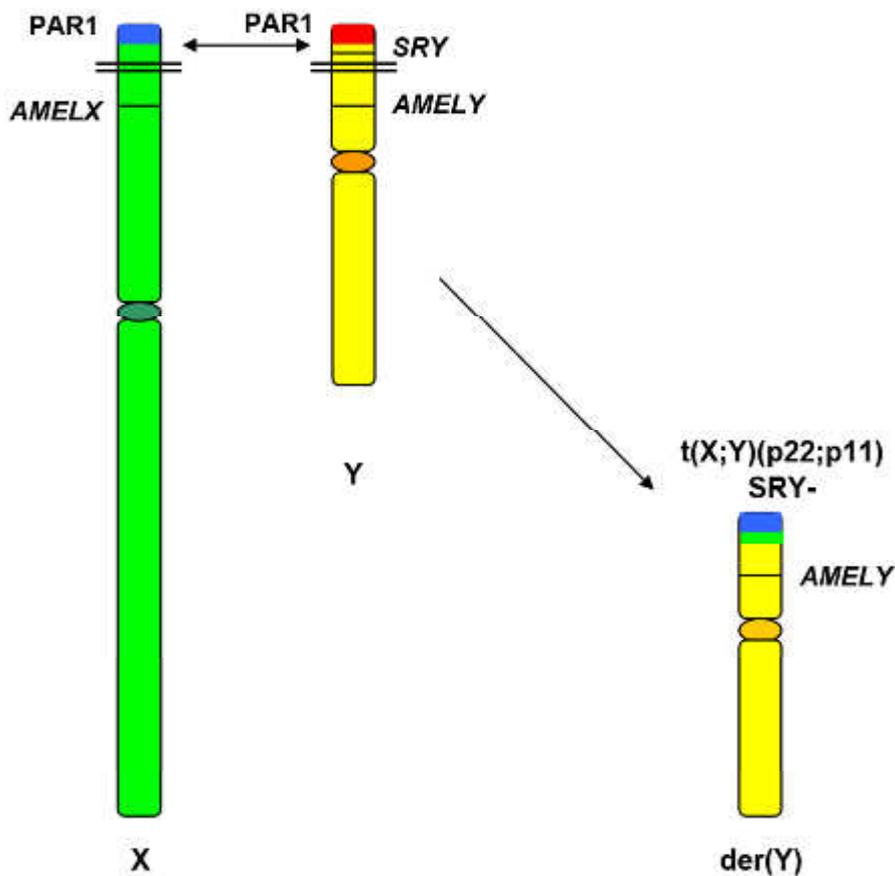


Рис. 35. Схематичное изображение механизма образования дериватной Y-хромосомы, возникающей вследствие Xp;Yp транслокации.

Наличие в его кодирующей области точковых мутаций не обнаружено ни у одного пациента. У одной пациентки с чистой формой дисгенезии гонад обнаружена частичная делеция гена *SRY*. У одного пациента (М.А.) впоследствии обнаружена мутация гена *SFI* (данные не приведены).

Среди пациенток данной группы с делецией гена *SRY* наблюдали примерно равное – 4:3 (а если не учитывать пациентку с дицентриком Yq, то равное – 3:3) число больных, у которых не обнаружены или обнаружены злокачественные опухоли гонад (гонадобластомы и/или дисгерминомы), соответственно. Однако частота опухолей гонад у *SRY*-негативных была выше (17,6%), чем *SRY*-позитивных (8%), при этом у всех пациенток, у которых были диагностированы опухоли имели кариотип 46,XY.

Таблица 24

Данные обследования пациентов с Y-позитивной дисгенезией гонад, которым проведено секвенирование гена SRY.

№	Код	Пол	Диагноз	Кариотип	Локусы		Наличие точковых мутаций гена SRY
					SRY	AMELX/Y	
1	SRY211	Ж	Дисгенезия гонад, дисгерминома	46,XY	+	+	Не обнаружено
2	SRY212	Ж	Дисгенезия гонад, дисгерминома	46,XY	+	+	Не обнаружено
3	SRY215	Ж	Дисгенезия гонад	46,XY	+	+	Не обнаружено
4	SRY232	Ж	Дисгенезия гонад, дисгерминома	46,XY	+	+	Не обнаружено
5	SRY268	Ж	Дисгенезия гонад	46,XY	Del 3' района гена SRY	+	обнаружено
6	SRY221	М	Дисгенезия гонад, неполная форма	46,XY	+	+	Не обнаружено
7	М.А.	Ж	Дисгенезия гонад, неполная форма	46,XY	+	+	Не обнаружено *
8	Т.А.	Ж	Дисгенезия гонад, неполная форма	46,XY	+	+	Не обнаружено
9	У.А.	Ж	Дисгенезия гонад, неполная форма	46,XY	+	+	Не обнаружено
10	Ф.М.	М	Дисгенезия гонад, неполная форма	mos 45,X[10]/47,XXY[6]/46,XX[2]/46,XY[12]	+	+	Не обнаружено
11	Ц.А.	М	Смешанная дисгенезия гонад	46,XY	+	+	Не обнаружено
12	К.И.	М	НФП, афалия	46,XY	+	+	Не обнаружено

Примечание: * - Выявлена мутация гена SFI.

Наиболее частой причиной полной («чистой») формы XY-дисгенезии гонад или синдрома Свайера являются микроструктурные перестройки Y-хромосомы с вовлечением дистальной части ее короткого плеча (Yp11.3), а также точковые мутации гена SRY [Berta et al., 1990; Осипова, 1997]. При этом, по крайней мере, половина из них обусловлена отсутствием локуса SRY вследствие структурных перестроек с вовлечением Yp11, в большинстве случаев вызванных аномальной X-Y рекомбинацией. На рисунке схематично отображен механизм образования дериватной (SRY-) Y-хромосомы, возникшей в результате X-Y транслокации. У 6 Y+/SRY- пациенток с дисгенезией гонад с дисгенезией гонад и кариотипом 46,XY, а также у 47,XXY женщины с кариотипом очевидно имело место подобная гоносомная перестройка. В последнем случае она сопровождалась дисомией по хромосоме X (в 98% клеток), возникшей в результате нерасхождения гоносом, вероятно, презиготического происхождения.

Ниже приводится описание клинического случая наиболее редкой гоносомной аномалии, обнаруженной у пациенток данной группы – кариотипа 47,XXY при женском фенотипе.

Клинический случай 5.

Пациент И., 25 лет обратилась с жалобами на вторичную аменорею. Родилась от первой беременности, в срок. Течение беременности без особенностей. Возраст матери и отца пробанда к моменту рождения составлял 21 год. При рождении вес больной 3500 г., рост 51 см. Развитие гениталий соответственно женскому полу.

Из анамнестических данных: у матери менструации регулярные до 46 лет. Кариотип матери 46,XX, отца 46,XY. Мать пробанда имеет еще одну дочь с регулярным менструальным циклом. У двоюродной сестры пробанда со стороны матери первичная аменорея, у троюродного брата со стороны отца умственная отсталость.

В детстве и юности пациентка росла и развивалась соответственно возрасту. Перенесенные заболевания: ОРВИ, ветряная оспа, краснуха в 16 лет, астматический бронхит с 12 лет (редкие обострения), миопия. Менархе в 14 лет, до 16 лет менструации были регулярными через 26 дней, по 5 дней, умеренные, безболезненные. В 16 лет перенесла стресс и краснуху, на этом фоне стала

отмечать задержки менструаций от 2 до 6 мес. До 23 лет олигоменорея, отсутствие стимулирующего эффекта на отмену проводимой гормонотерапии гестагенами и комбинированными оральными контрацептивами (КОК). С 23 до 24 лет отмечали восстановление регулярного ритма менструаций, но с 24 лет по настоящее время стойкая аменорея.

Данные осмотра: пациентка правильного телосложения, рост 182 см, вес 72 кг, половое развитие по женскому типу, соответственно возрасту. Какие-либо аномалий развития не отмечено, интеллект сохранен.

При эндокринологическом исследовании обнаружено выраженное повышение уровня гонадотропных гормонов при гипофункции гонад – гипергонадотропный гипогонадизм. Результаты исследования гормонов крови: ЛГ – 28,6 МЕ/л; ФСГ – 52,1 МЕ/л; Пролактин – 109 мМЕ/л; E_2 – 145 пмоль/л; тестостерон – 2,0 нмоль/л; ДГАС – 5,1 мкмоль/л; СТГ – 0,8 мМЕ/л; ТТГ – 0,9 мМЕ/л; T_3 – 2,0 нмоль/л; $T_{4св}$ – 14,5 пмоль/л; АТ-ТГ – 19 МЕ/мл; АТ-ТРО – 24,7 МЕ/мл; 17-ОНР – 2,0 нмоль/л.

При выполнении ультразвукового исследования (УЗИ) надпочечников выявлена аденома левого надпочечника диаметром около 0,8 см. Проведение магнитно-резонансной томографии (МРТ) надпочечников подтвердило наличие гиперплазии левого надпочечника размером 0,8 см. При УЗИ малого таза обнаружена матка размером 4,1×3,1×4,6 см; объемом 30,4 см³; М-эхо – 0,4 см. Правый яичник 1,6×0,9×1,8 см, в нем единичные включения 0,7 см, объемом 1,2 см³. Левый яичник не определяется.

При лапароскопии обнаружено: матка 4,5×4,0×3,0 см, без патологических изменений; левый яичник размером 1,5×0,5×0,6 см, правый яичник размером 1,5×0,5×0,5 см, фолликулы не обнаружены. Правая и левая маточные трубы проходимы.

По результатам гистологического исследования биоптированной ткани левого и правого яичников: яичники с утолщенной белочной оболочкой, белыми телами, фолликулы не обнаружены.

По результатам стандартного цитогенетического исследования кариотип пациентки определен как немозаичный 47,XXY. По проведении молекулярно-цитогенетического исследования, выполненного на лимфоцитах периферической крови обнаружен гоносомный мозаицизм с наличием двух клонов 47,XXY (98,1%)

и 46,XY (1,9%). Результаты FISH анализа: nuc ish (DXZ1×2, DYZ3×1) [504] / (DXZ1×1, DYZ3×1) [10].

Пациентке выполнен молекулярный анализ Y-хромосомы с исследованием различных последовательностей ее короткого и длинного плеча. Результаты ПЦР с праймерами для локусов *SRY* и *AMELX/AMELY* свидетельствовали об отсутствии части короткого плеча Y-хромосомы. Исследование последовательностей длинного плеча Y-хромосомы не выявило наличия микроделечий в локусе *AZF*. Картирование точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы свидетельствовало об их локализации в локусе *Yp11.2* между маркерами *sY1248* и *sY211* (см. далее результаты картирования точек разрыва в Y-хромосоме у пациентов с аномалиями гоносом).

Заключительный диагноз: гоносомнообусловленное НФП вследствие редкой аномалии половых хромосом, мозаичный кариотип 47,XXY(98,1%)/46,XY(1,9%). Преждевременная недостаточность яичников, вторичная аменорея.

Кариотип 47,XXY описан в единичных случаях у женщин (в качестве редкого цитогенетического варианта XY-дисгенезии гонад [Gerli et al., 1979; Röttger et al., 2000], а также синдрома тестикулярной феминизации в сочетании с нерасхождением хромосомы X [Bartsch-Sandhoff et al., 1976; Schmid et al., 1992; Saavedra-Castillo et al., 2005].

*Отсутствие Y-специфичных последовательностей обнаружено у 10,8% Y-позитивных больных с XY-дисгенезией гонад, имеющих женский фенотип. В редких случаях она обусловлена скрытым мозаицизмом по хромосоме и/или перестройками (в частности, изодицентрическими Y-хромосомами). В последнем случае, выявленная потеря последовательностей локуса *SRY* обусловлена самой перестройкой и расположением точек разрыва проксимальной части короткого плеча Y-хромосомы. В большинстве случаев отсутствия последовательности гена *SRY* и наличие последовательности *AMELY* (локус *Yp11.2*), что может свидетельствовать о его потере дистальной части *Yp11* и ее замещением дистальной частью *Xp22* на дериватной Y-хромосоме, *der(Y)*, образовавшейся вследствие *Xp;Yp* транслокации. В редких случаях аномальная рекомбинация может возникать в пределах локуса *SRY*, приводя к частичной делеции его*

кодирующей области данного гена, У пациенток женского пола с XY-дисгенезией гонад не обнаружено делеций эухроматина длинного плеча Y-хромосомы.

3.6. Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с XX-дисгенезией гонад.

Наличие скрытого мозаицизма по хромосоме Y или ее последовательностям могут быть причиной нарушения дифференцировки гонад. С целью поиска последовательностей Y-хромосомы у пациентов с XX-дисгенезией гонад проведен анализ гена SRY, пары X-Y гомологичных локусов (AMELX/AMELY) и последовательностей длинного плеча Y-хромосомы (регионы AZFa, AZFb и AZFc). Амплификацию последовательности AMELX использовали в качестве внутреннего контроля ПЦР.

В данную группу обследованных вошли 25 пациентов, возраст которых составил от 1 до 31 года. Из них с 24 больных женского пола с XX-дисгенезией гонад и 1 пациент (Н.В., 5 лет), зарегистрированный в мужском паспортном поле, имеющий двойственное развитие половых органов (табл. 25). Причинами обращения для проведения генетического обследования у пациентов, являлись первичная или вторичная аменорея (у обратившихся девушек и женщин), гипогонадизм и/или задержка полового развития, гипоплазия половых органов (наружных гениталий, матки и яичников), новообразования в гонадах (в 3 случаях), а в одном случае – наличие множественных пороков развития и задержка психомоторного развития (табл. 25).

По данным стандартного цитогенетического исследования 18 из 25 (64%) пациентов данной группы имели нормальный женский кариотип (46,XX), у остальных 7 (36%) больных обнаружены хромосомные мутации и следующие кариотипы:

- инверсия хромосомы 3 – 46,XX,inv(3)(p24.2;q21)mat (Л.О.);
- маркерная хромосома, предположительно дериват X-хромосомы: 46,X,mar (SRY194), 46,XX/46,X,mar (SRY3) ;
- X-X транслокация – 46,X,der(X)t(X;X)(q22;p11.2) (An6);
- Xq делеции: 46,X,del(X)(q22.3) (An396/M.E.) и
- 46,X,del(X)(q22) (П.А./SRY269),
- мозаицизм 46,X,del(X)(q22)(90,5%)/47,XY,del(X)(q22)(9,5%) (SRY57).

Данные обследования пациентов с XX-дисгенезией гонад.

№	Код пациента	Возраст, лет	Пол	Диагноз, фенотип	Кариотип, результаты FISH анализа	Результаты ПЦР для ЛОКУСОВ:		
						SRY	AMELY/AMELX	AZF
1	SRY144	15	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, дисгерминома, гонадобластома (?)	46,XX	+	+	+
2	SRY14	13	Ж	Дисгенезия гонад	46,XX	-	-	+
3	SRY38	16	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I,	46,XX	-	-	+
4	SRY48	16	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I,	46,XX	-	-	+
5	SRY58	15	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, гипоплазия матки и яичников	46,XX	-	-	+
6	SRY103	28	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, гипоплазия матки и яичников	46,XX	-	-	+
7	SRY114	15	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, гипоплазия матки и яичников	46,XX	-	-	+
8	SRY123	6	Ж	Дисгенезия гонад, гипоплазия матки, новообразование в левой гонаде	46,XX	-	-	+
9	SRY128	17	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, гипоплазия матки и яичников, дисгерминома	46,XX	-	-	+
10	SRY193	16	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, гипоплазия матки и яичников	46,XX	-	-	+
11	SRY194	1	Ж	Дисгенезия гонад, гипоплазия гениталий	46,X,mar (mar - derX)	-	-	+
12	SRY3	1	Ж	МВПР, ЗППР	46,XX/46,X,mar (mar - derX)	-	-	+
13	SRY196	16	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I, гипоплазия матки и яичников	46,XX	-	-	+
14	SRY244	17	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I	46,XX	-	-	+
15	Л.О.	17	Ж	Дисгенезия гонад XX, аменорея I	46,XX,inv(3)(p24.2;q21)	-	-	+
16	Апб	31	Ж	Дисгенезия гонад XX, аменорея I	46,X,der(X)t(X;X)(q22;p11.2),	-	-	+

№	Код пациента	Возраст, лет	Пол	Диагноз, фенотип	Кариотип, результаты FISH анализа	Результаты ПЦР для локусов:	
						SRY	AMELY/AMELX/AZF
					nuc ish(DXZ1×1)[20]/(DXZ1×3)[6]/(DXZ1×2)[474]		
17	SRYS7	17	Ж	Дисгенезия гонад XX, аменорея II	mos46,X,del(X)(q22)[19]/47,XY,del(X)(q22)[2]	-	+
18	SRYS183	13	Ж	Дисгенезия гонад XX, аменорея	46,XX	-	+
19	SRYS61	27	Ж	Дисгенезия гонад XX, аменорея	46,XX	-	+
20	SRYS72	15	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея II	46,XX	-	+
21	SRYS72	30	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея	46,XX	-	+
22	Ж.	10	Ж	Дисгенезия гонад, гипоплазия матки	46,XX, nuc ish(DXZ×1)[30]/(DXZ×2)[270]	-	+
23	Ап396 (М.Е.)	25	Ж	Дисгенезия гонад XX, аменорея I	46, X, del(X)(q22.3), nuc ish(DXZ×2)[300]	-	+
24	SRYS269	6	Ж	Гonosомнообусловленное НФП, дисгенезия гонад	46, X, del(X)(q22), ish der(X)t(X; Y)(q21.3p11.3) (DXZ1+, SRY+) nuc ish(DXZ1×2, SRY×1)[200]	+	-
25	Н.В.	5	М	Дисгенезия гонад. Двойственное развитие половых органов (наличие пениса, гонады в виде тяжей, маточные трубы с обеих сторон)	46,XX	-	+

У пациентки SRY194 с кариотипом 46,X,mar, отмечен женский фенотип с наличием гипоплазии половых органов. У больной SRY3, у которой в кариотипе обнаружена маркерная хромосома, но в мозаичной форме, отмечали наличие женского фенотипа, множественных пороков развития (МВПР) и задержку психомоторного развития (ЗПМР). Хотя молекулярно-цитогенетическое обследование (FISH анализ для определения происхождения маркерной хромосомы) в данных случаях не проводили, судя по результатам ДНК-исследования (отсутствие последовательностей Y-хромосомы) обнаруженная в кариотипе маркерная хромосома являлась дериватом хромосомы X. Вероятно, что структурная перестройка X-хромосомы являлась причиной аномалий развития у данных пациенток. У больной SRY194 не было отмечено наличие явных признаков, характерных для синдрома Шерешевского-Тернера, возможно за счет отсутствия мозаицизма с клоном 45,X, однако с учетом возраста пациентки нельзя исключить, что у нее возможно появление признаков, характерных для СШТ (перекрываемость с дисгенезией гонад, наблюдаемая при некоторых структурных перестройках X-хромосомы, а также при в ряде случаев гоносомного мозаицизма).

Обследование матери и родной сестры пациентки с перичентрической инверсией хромосомы 3 (пациент Л.О.), позволило установить, что данная хромосомная перестройка имеет происхождение – 46,XX,inv(3)(p24.2;q21)mat, а у здоровой сестры, у которой не наблюдали нарушений менструального цикла, выявлен нормальный женский кариотип (46,XX). Примечательно, что у матери пробанда, имевшей возраст 42 года, в анамнезе отмечена нерегулярность менструального цикла и повышение уровня ФСГ – признаки, указывающие преждевременно наступающую менопаузу, возможно синдром преждевременной недостаточности яичников (СПНЯ).

Отсутствие последовательностей Y-хромосомы определено у больных с XX-дисгенезией гонад за исключением одной пациентки (SRY144). У данной больной 15 лет с первичной аменореей и половым инфантилизмом обнаружено наличие опухоли гонады слева (предположительно дисгерминомы или гонадобластомы), а по результатам гормонального обследования – гипергонадотропного гипогонадизма (повышенные уровни ЛГ и ФСГ и сниженный уровень эстриола). При цитогенетическом исследовании все 40 исследованных метафазных пластинок

имели кариотип 46,XX. С помощью мультиплексной ПЦР выявлено наличие локусов *SRY* и *AMELY* и всех исследованных маркеров длинного плеча Y-хромосомы, что свидетельствовало о наличии у данной пациентки скрытого гоносомного мозаицизма с наличием Y-несущего клона (табл. 25).

Терминальная делеция Xq22 также была обнаружена у другой больной данной группы – пациентки М.Е. (An396), первичный кариотип 46,X,del(X)(q22), повторный - 46,X,del(X)(q22.3). По результатам FISH анализа и КФ-ПЦР не обнаружено наличие Y-хромосомы, в том числе последовательностей *SRY*, *AMELY*, *ZFY*, а также явного мозаицизма по хромосоме X, кроме того, результаты КФ-ПЦР подтвердили наличие Xq делеции, а также свидетельствовали о наличии скрытой дупликации короткого плеча X-хромосомы, захватывающей локус Xp22.31 (табл. 26).

Таблица 26

Типирование по маркерам хромосом X, Y у пациентки М.Е. (An396).

Название маркера	Локус	Количество аллелей	Соотношение аллелей
TAFL	X/хромосома 3	+/+	1:2
DXS8378	Xp22.31	2	2:1
DXS10135	Xp22.31	2	2:1
DXS10148	Xp22.31	2	2:1
ZFX/ZFY	Xp/Yp11	1/-	-
DXS7132	Xq11.2	2	1:1
DXS10079	Xq11.2	2	1:1
DXS10074	Xq11.2	2	1:1
DXS6803	Xq21.2	1	-
DXS1187	Xq26.1	1	-
DXS10103	Xq26.2	1	-
XHPRTB	Xq26.2	1	-
DXS10101	Xq26.2	1	-
DXS10146	Xq28	1	-
DXS10134	Xq28	1	-
DXS7423	Xq28	1	-

У пациентки SRY57, 17 лет по результатам цитогенетического исследования обнаружено гоносомный мозаицизм с минорным Y-несущим клоном, а также двух X-хромосом, одна из которой имела терминальную делецию длинного плеча -

del(X)(q22), однако согласно результатам молекулярно-генетического обследования (ПЦР и КФ-ПЦР) каких-либо последовательностей Y-хромосомы не было обнаружено (табл. 25), поэтому первичный кариотип расценен как неправильно определенный, без наличия Y-хромосомы. При обследовании у нее обнаружено нормальное развитие наружных половых органов по женскому типу, матку размером 3×4 см, маточные трубы с обеих сторон без признаков патологических изменений, яичники в виде тяжей справа 0,1×0,3 см, слева 0,1×0,3 см. По результатам гистологического исследования биоптатов гонад выявлено наличие ткани яичников без фолликулярного аппарата, примордиальные фолликулы не обнаружены. Обследование матери и родной сестры пациентки с перичентрической инверсией хромосомы 3 (пациент Л.О.), позволило установить, что данная хромосомная перестройка имеет происхождение – 46,XX,inv(3)(p24.2;q21)mat, а у здоровой сестры, у которой не наблюдали нарушений менструального цикла, выявлен нормальный женский кариотип (46,XX). Примечательно, что у матери пробанда, имевшей возраст 42 года, в анамнезе отмечена нерегулярность менструального цикла и повышение уровня ФСГ – признаки, указывающие преждевременно наступающую менопаузу, возможно синдром преждевременной недостаточности яичников (СПНЯ).

У пациентки SRY57, 17 лет по результатам цитогенетического исследования обнаружено гоносомный мозаицизм с минорным Y-несущим клоном, а также двух X-хромосом, одна из которой имела терминальную делецию длинного плеча - del(X)(q22), однако согласно результатам молекулярно-генетического обследования (ПЦР и КФ-ПЦР) каких-либо последовательностей Y-хромосомы не было обнаружено (табл. 26), поэтому первичный кариотип был расценен как неправильно определенный, без наличия Y-хромосомы. При обследовании у нее обнаружено нормальное развитие наружных половых органов по женскому типу, матку размером 3×4 см, маточные трубы с обеих сторон без признаков патологических изменений, яичники в виде тяжей справа 0,1×0,3 см, слева 0,1×0,3 см. По результатам биопсии гонад: яичники без фолликулярного аппарата, примордиальные фолликулы не обнаружены.

Терминальная делеция Xq22 также была обнаружена у другой больной данной группы – пациентки М.Е. (An396), кариотип которой первично был определен как

46,X,del(X)(q22), а повторно – 46,X,del(X)(q22.3). По результатам FISH анализа и КФ-ПЦР не обнаружено наличие Y-хромосомы, в том числе последовательностей *SRY*, *AMELY*, *ZFY*, а также явного мозаицизма по хромосоме X (табл. 25), кроме того, результаты КФ-ПЦР подтвердили наличие Xq делеции, а также свидетельствовали о наличии скрытой дупликации короткого плеча X-хромосомы, захватывающей локус Xp22.31 (табл. 26).

Два наиболее примечательных клинических случая XX-дисгенезии гонад, связанных с гоносомными транслокациями: с X-X транслокацией (An6) и X-Y транслокаций (SRY269) приведены ниже.

Клинический случай 6.

Пациентка Б.3. (An6), 31 г. была направлена из ФБГУ ЭНЦ РАМН для проведения цитогенетического обследования с диагнозом: Первичная аменорея, акрогигантизм (?), высокий рост (2 м 15 см). Признаков двойственности развития органов половой системы, поражения надпочечников, а также гипоталамо-гипофизарной области не было обнаружено. Клиническая картина не позволяла отнести пациентку к какому-либо генетическому синдрому.

Пациентке Б.3. проведено цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование на лимфоцитах периферической крови (табл. 25). Кариотип: 46,X,der(X)t(X;X)(q22;p11.2), т.е. обнаружено наличие женского кариотипа с присутствием одной нормальной хромосомы X и одной перестроенной (в результате X-X транслокации) хромосомы X, несущей материал двух коротких плечей (Xp) и фрагмент проксимальной части длинного плеча (Xq) (рис. 36).

Для исключения мозаицизма по хромосоме X выполнено молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH анализ), которое выявило наличие скрытого сложного гоносомного мозаицизма с наличием клеточных линий, несущих 1, 2 или 3 хромосомы X: X(4%)/XX(94,8%)/XXX(1,2%), при этом дериватной хромосомы X в большинстве клеток была представлена в одной копии, в других линиях ее количество составляло от 0 до 2 (рис. 37). Учитывая, что нормальная хромосома X несет 1 копию гена *SHOX* (Xp22.3), контролирующего рост, а данная перестроенная хромосома X – 2 копии, то количество копий гена *SHOX* в разных клонах варьировала от 1 до 5, при этом в большинстве лимфоцитов периферической крови выявлено наличие 3 его копий.

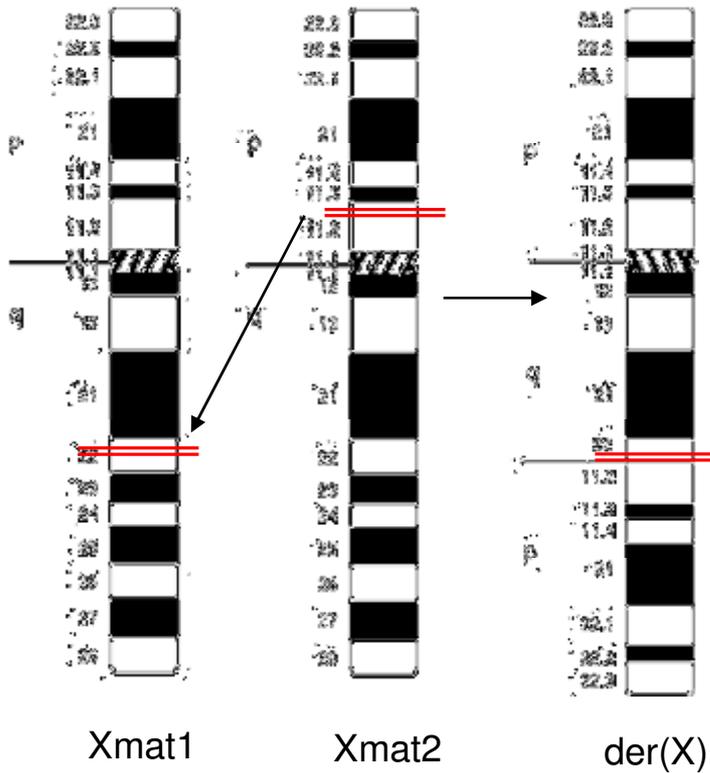


Рис. 36. Схематичное изображение механизма образования X-X транслокации у пациентки Б.З. (An6).

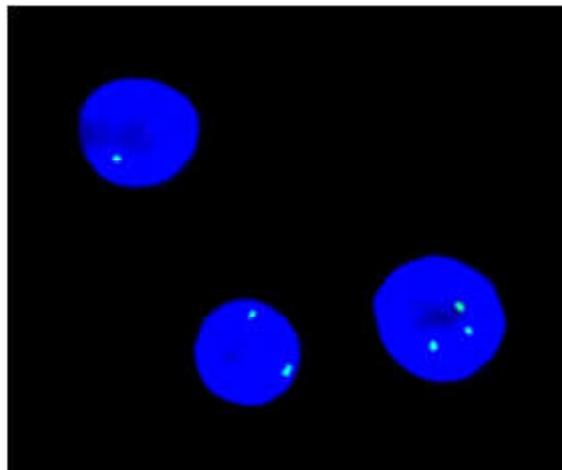


Рис. 37. Результаты интерфазного FISH-анализа с пробой DXZ1 на ядрах лимфоцитов у пациентки Б.З. (An6) с кариотипом 46,X,der(X)t(X;X)(q22;p11.2). Выявлен мозаицизм по X-хромосоме с наличием трех клонов: X/XX/XXX (по наличию 1, 2 и 3 зеленых гибридизационных сигналов, соответственно).

Результаты КФ-ПЦР подтвердили у пациентки Б.З. наличие структурной перестройки хромосомы X с наличием 1-3 ее аллелей (рис. 38).

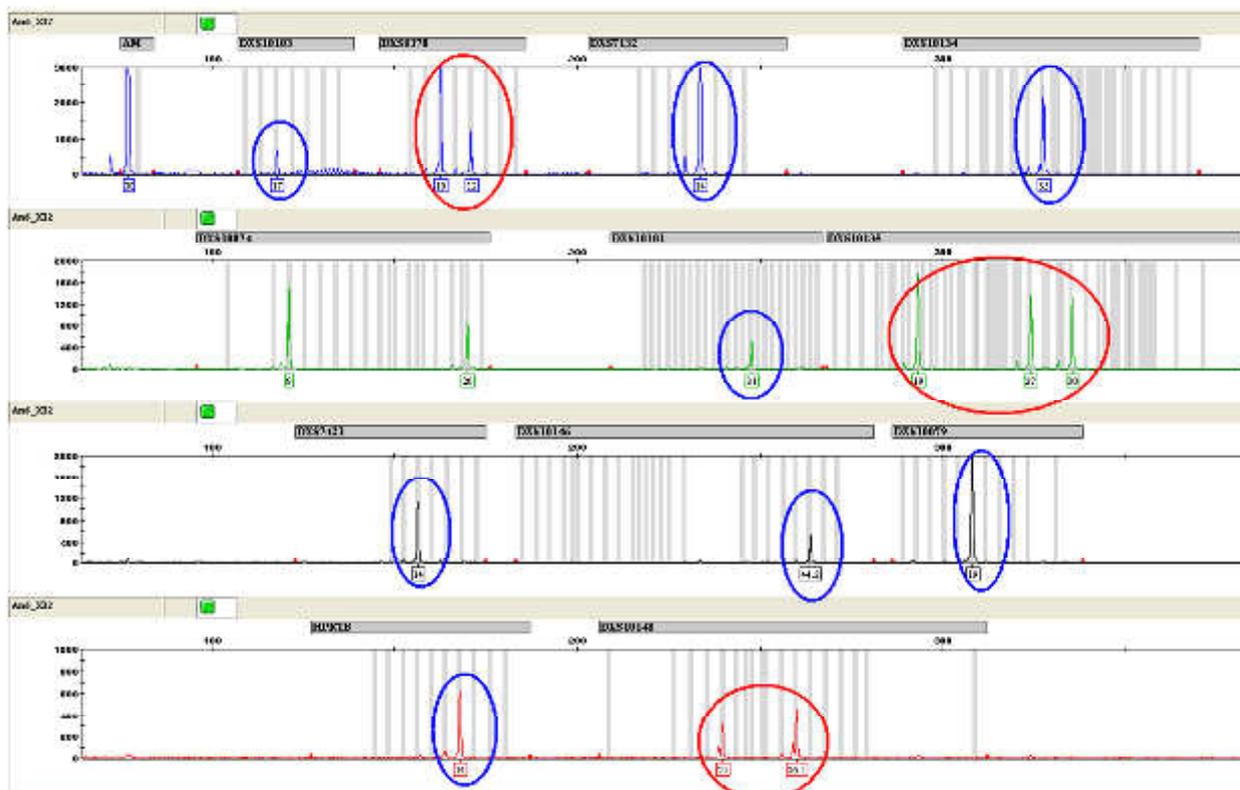


Рис. 38. Результаты КФ-ПЦР анализа у пациентки Б.З. (An6) с X-X транслокацией.

При ДНК-исследовании наличия последовательностей, специфичных для Y-хромосомы не обнаружено. Молекулярно-генетическое исследование пробанда и его родителей позволило установить, что перестроенная хромосома X – der(X) имеет материнское происхождение. Она возникла в результате аномальной рекомбинации гомологичных хромосом X в профазе I мейоза в ходе оогенеза. Выявленная перестройка генетически близка к трисомии по хромосоме X. Анализ характера инактивации хромосомы X (XCI) свидетельствовал о неравномерной соотношении инактивации X-хромосом. Перестроенная хромосома X характеризовалась выборочной инактивацией, при этом соотношение XCI – инактивация перестроенной хромосомы – Xmat(der) и неперестроенной Xpat равнялось 79% : 21%. Согласно наличию первичной аменореи и дисгенезии гонад, а также результатам генетического обследования (обнаруженную X-X транслокацию и мозаицизм по хромосоме X), у пациентки Б.З. (An6) присутствовала редкая клиническая форма и XX-дисгенезии гонад,

цитогенетический вариант которой характеризовался структурной aberrацией X-хромосомы и мозаицизмом по перестроенной хромосоме.

Клинический случай 7.

Пациентка П.А. (SRY269), 6 лет направлена в МГНЦ РАМН для медико-генетического обследования и консультирования по поводу двойственного строения наружных половых органов. Ребенок родился от первой доношенной беременности, протекавшей без осложнений. Вес 3530 г, рост 53 см. При рождении, отмечено неправильное развитие наружных половых органов. Паспортный пол пациентке был определен как женский, воспитание в женском поле. Раннее развитие больного без особенностей.

Стандартное цитогенетическое исследование, проведенное не выявило причин вирилизации – кариотип 46,X,del(X)(q22). Родители пробанда здоровы, не являются родственниками. Кариотипы родителей нормальные (мать – 46,XX, отец – 46,XY).

Предварительно диагноз пациентке был поставлен ВДКН. Исследование сыворотки крови на 17-гидроксипрогестерон – 2,54 нмоль/л (норма: < 20 нмоль/л) и электролиты: натрий, калий - норма, а также отсутствие мутаций в гене CYP21ОНВ (по данным молекулярно-генетического исследования) позволило исключить наличие врожденной гиперплазией коры надпочечников, обусловленной дефицитом 21-гидроксилазы.

Уретровагиноцистоскопия (в возрасте 1,5 года): влагалище впадает в урогенитальный синус на уровне уретрального сфинктера. Длина влагалища 5 см, шейка матки в типичном месте. Проподимость уретры не нарушена. Слизистая оболочка мочевого пузыря не изменена. Устья мочеточников расположены типично, сомкнуты плотно. В возрасте 2 лет выполнена лапароскопическая гонадэктомия.

При операции обнаружено: гипоплазированная матка (длиной 1,5 см), расположенная по средней линии представлена дубликатурой брюшины. На левой маточной трубе с гипоплазированным фибральным концом расположена фрагментированная гонада, напоминающая рудиментарный тестикул, размером 0,8×0,5 см. На правой маточной трубе расположена гонада в виде тяжа (стрек), размером 0,3×0,5 см. Обе гонады удалены. Выполнена резекция клитора, частичное

рассечение урогенитального синуса, выполнена пластика половых губ.

Данные гистологического исследования биоптатов гонад:

Левая гонада – фрагменты ткани незрелого яичка, придатка. В ткани яичка определяются многочисленные мелкие без просвета семенные канальцы. Эпителий канальцев состоит из 1-2 рядов клеток с мономорфными ядрами. Клетки Сертоли и клетки Лейдига не обнаружены. Отек стромы. По краю яичка овариальноподобная строма со склерозом белочной оболочки. В прилегающих тканях обнаруживается придаток, представленный тяжами грубоволокнистой соединительной ткани с многочисленными расширенными канальцами. Эпителии, выстилающий протоки, с атрофическими изменениями. Рядом и по краю определяются структуры с просветом звездчатой формы, выстланные цилиндрическим эпителием с формированием “ворсинок”, напоминающие маточную трубу.

Правая гонада – фрагменты ткани незрелого яичка, придатка и маточной трубы. Ткань яичка обнаружена в одном из полей зрения в виде группы деформированных тубулярных структур, выстланных уплощенным эпителием или клетками с ‘оптически пустой’ цитоплазмой. К этому участку прилегает овариально-подобная строма. В отдельных полях зрения в ней встречаются железистоподобные структуры. В прилегающих тканях обнаруживается придаток, представленный тяжами грубой волокнистой соединительной ткани с многочисленными расширенными канальцами. Эпителий, выстилающий протоки, с атрофическими изменениями. Рядом определяются структуры маточной трубы, выстланные цилиндрическим эпителием с наличием пузырьковидных и штифтиковых клеток. Наружная сторона представлена фимбральными структурами.

Данные объективного исследования (в возрасте 5 лет 10 мес.): Телосложение детское, кожа смуглая. Дистального оволосения нет. Подкожно-жировой слой развит избыточно, распределен равномерно. Мышечный тонус в норме. По внутренним органам – без особенностей. Данные антропометрии: рост – 130 см, вес – 32 кг, индекс массы тела (ИМТ) – 18,9; костный возраст – 5 лет 9 мес. (соответствует возрасту).

Результаты гормонального обследования (в возрасте 5 лет 10 мес.): ЛГ – 0,98 мЕ/л, ФСГ – 0,92 мЕ/л, Тестостерон – 0,35 ммоль/л, эстрадиол – менее 46 пмоль/л, пролактин – 11,13 мЕ/л, Дегидроэпиандростерон сульфат (ДЭА-С) - 0,2 мкмоль/л.

Status genitalis: Наружные половые органы сформированы по женскому типу, после проведения оперативной коррекции. Половая формула: $Ma_0P_0Ax_0Me_0$. Стадия полового созревания по Таннеру – I.

Данные ультразвукового исследования: При УЗИ органов малого таза: за мочевым пузырем трубчатое образование диаметром 3 мм, тело матки четко не определяется, по задней стенке влагалища округлое образование 9×9 мм. Гонады не визуализируются. При УЗИ органов брюшной полости патологических изменений не выявлено.

Результаты медико-генетического обследования:

При стандартном цитогенетическом исследовании у пациентки П.А. (SRY269) обнаружен женский кариотип с присутствием терминальной делеции длинного плеча хромосомы X – del(X)(q22). Результаты молекулярного анализа свидетельствовали об присутствии у больного последовательностей короткого плеча (SRY, ZFY) и отсутствие последовательностей локуса AMELY и всех из исследованных маркеров длинного плеча Y-хромосомы, что свидетельствовало о наличии скрытой транслокации фрагмента Yp11. Картирование точки разрыва в коротком плече хромосомы Y (в локусе Yp11.2 между маркерами sY211 и sY1240), результаты которого будут подробно изложены ниже в разделе обследования пациентов с синдромом 46,XX-мужчина (XX-инверсии пола). С целью установления локализации гена SRY, идентификации перестроенной хромосомы X и исключения гоносомного мозаицизма проведено молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование для уточнения типа перестройки X-хромосомы (рис. 39 и 40).

По результатам цитогенетического и молекулярно-цитогенетического обследования кариотип пациентки П.А. (SRY269) определен как: 46,X,del(X)(q22), ish der(X)t(X;Y)(q21.3p11.3)(DXZ1+,SRY+) nuc ish (DXZ1×2,SRY×1)[200] (рис. 39).

По данным КФ-ПЦР с праймерами следующих локусов X-хромосомы: DXS9896 (Xp21.1), SBMA (Xq11.2), DXS6803 (Xq21.31), XHPRT (Xq26.2) и

DXS1187 (Xq26.2) точка разрыва в X-дерииватной хромосоме располагается между локусами DXS6803 (Xq21.31) и DXS1187 (Xq26.2).

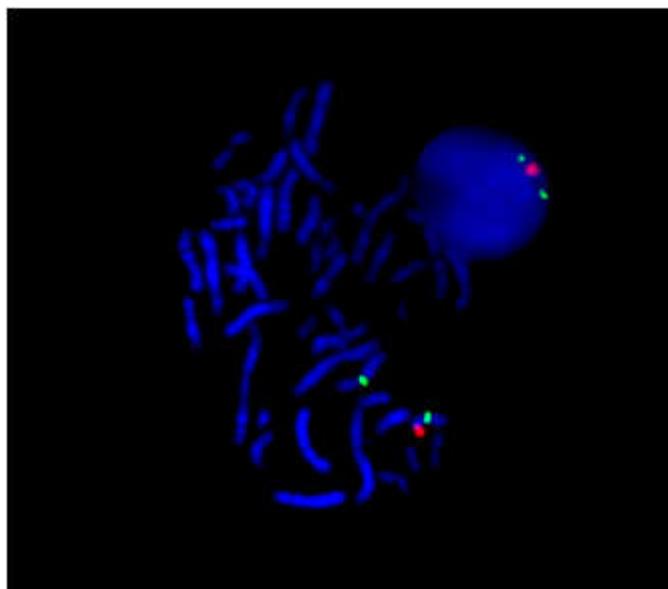


Рис. 39. Результаты анализа FISH с использованием ДНК-проб LSI SRY и DXZ1 на культивированных лимфоцитах периферической крови у пациентки П.А. (SRY269). Примечание: В левой половине – метафазная пластинка с двумя хромосомами X, несущими зеленый сигнал (локус DXZ1), маркирующий центромерный регион, Xcen: нормальную хромосому X (с одним зеленым сигналом) и дерииватную хромосому X с одним зеленым сигналом и одним красным сигналом, расположенным на Xq21.3 (локус SRY, Yp11.3); Справа в верхней части – интерфазное ядро лимфоцита: с двумя зелеными сигналами (DXZ1) и одним сигналом (SRY).

Учитывая результаты цитогенетического исследования (транслокацию материала Yp11 на терминальную часть длинного плеча дерииватной X-хромосомы с точкой разрыва оцененной как Xq22, наиболее вероятно точка разрыва располагается в интервале Xq21.3-Xq22 (рис. 41).

Таблица 27

Результаты КФ-ПЦР с маркерами X- и Y- хромосом у пациентки П.А.

Название маркера	Локус	Число аллелей	Соотношение аллелей
AMELX	Xp22	1	-
ZFX/ZFY	Xp/Yp11	1/1	2:1
DXS6803	Xq21.2	2	1:1
DXS9896	Xq21.3	2	1:1
DXS1187	Xq26.1	1	-
TAFL	X/хромосома 3	1/1	1:1

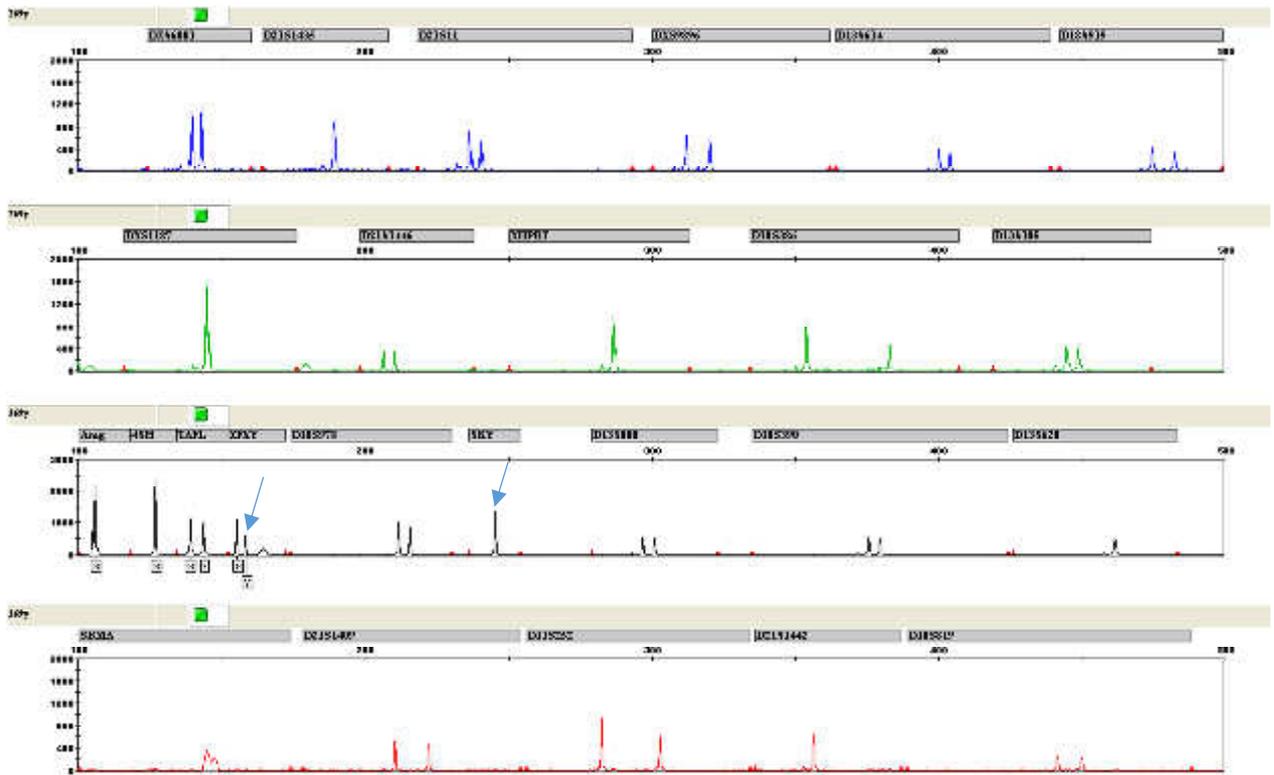


Рис. 40. Результаты КФ-ПЦР, выполненной у пациентки П.А. (SRY269). Синими Стрелками указаны сигналы от маркеров короткого плеча хромосомы Y (*SRY* и *ZFY*).

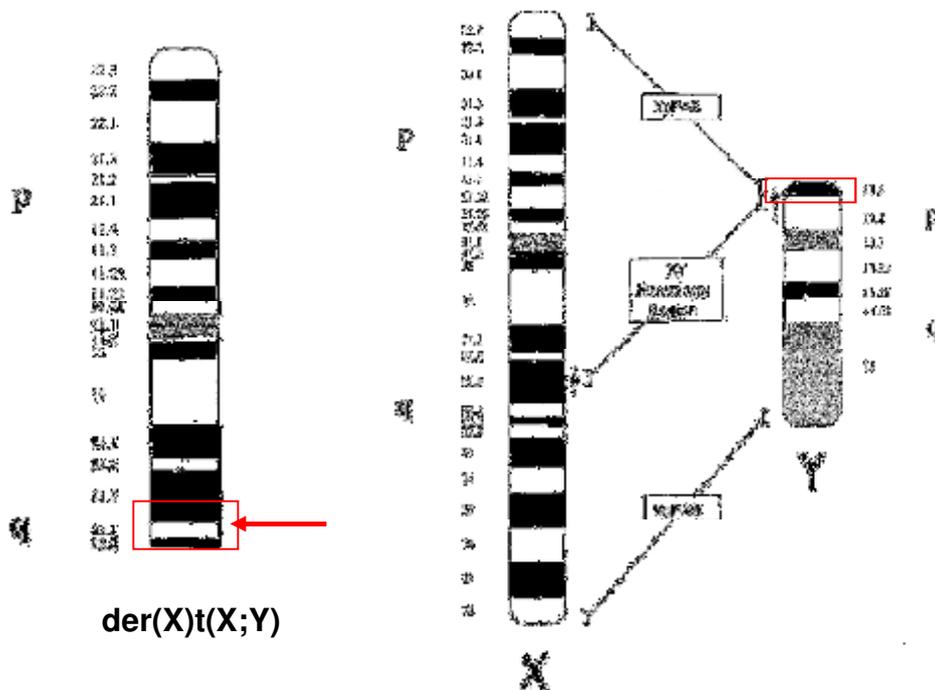


Рис. 41. Идиограммы хромосом X и Y, и перестроенной дериватной хромосомы X – *der(X)t(X;Y)* у пациентки П.А./SRY269. Положение X-Y гомологичного региона (Xq21.3/Yp11.2) и регионов PAR показаны. Транслоцированный фрагмент заключен в красную рамку, предполагаемая точка разрыва в Xq указана стрелкой.

Таким образом, по результатам комплексного генетического исследования пациентки П.А. установлено, что перестроенная хромосома X представляет собой дериват хромосомы X, возникший в результате транслокации фрагмента дистальной части короткого плеча хромосомы Y (Yp11.3) на длинное плечо хромосомы X с потерей терминальной ее части (Xq21.3-Xqter). Не обнаружено скрытого мозаицизма по X-хромосоме. Заключительный диагноз: Нарушение формирования пола, дисгенезия гонад вследствие гоносомной аномалии (кариотип 46,X,der(X)t(Y;X)(p11.3q21.3), SRY+, состояние после двусторонней гонадэктомии и феминизирующей пластики.

Следует отметить, что генетические изменения, обнаруженные у пациента П.А. (SRY269), представляют собой гоносомную аномалию, которая характерна для большинства случаев (Yr+)XX-инверсии пола (46,XX тестикулярной формы НФП или редких случаев (Yr+)46,XX овотестикулярной формы НФП). Однако в данном случае нарушение половой дифференцировки не привело ни к формированию двойственно развитых гонад (овотестис), ни к развитию тестикул. В литературе описаны редкие случаи НФП с ассиметричной дифференцировкой гонад и двойственным развитием гениталий, имеющих XX-инверсию пола, в том числе кариотип 45,X (по лимфоцитам периферической крови) [Kosova et al., 1995]. У пациента, сообщенного Косова и соавторами, выявлено наличие ассиметричной дифференцировки гонад (тестикул – слева, в мошонке и стрек-гонада – справа, в паховой грыже), наличие матки и маточной трубы справа, влагалища, уrogenитального синуса, расщепленной мошонки и полового члена длиной 3 см с хордой. Пациенту был выбран женский пол. К 14,5 годам у пациента отмечен спонтанный пубертат (половое развитие по Таннеру II по развитию молочных желез и лобковому оволосению), гипергонадотропный гипогонадизм и низкий рост. FISH анализ позволил выявить межтканевой мозаицизм 45,X(55%)/46,X,del(X)(q?)(45%) и наличие фрагмента Y-хромосомы, несущего ген *SRY*, в ткани левой гонады и кариотип 45,X, и отсутствие гена *SRY* в ткани правой гонады. В лимфоцитах периферической крови и фибробластах кожи был установлен кариотип 45,X и обнаружено наличие последовательностей, специфичных для гена *SRY* и локусов *PABY*, *ZFY*, *DYZ3*, *KALY* и *DYZ1*. Точки разрыва в длинном плече X-хромосомы в случае Косова и соавторов не были точно установлены, вероятно в локусе Xq22. Не

исключено, что в данном случае, также как у пациентки П.А. (SRY269) имела место X-Y транслокация с фрагмента Y-хромосомы с геном *SRY*, транслоцированного на Xq.

*Таким образом, в группе пациентов с XX-дисгенезией гонад наличие хромосомных мутаций обнаружено у 9 из 25 (36%) пациентов. Большинство из них (8 из 9) были обусловлены аномалиями половых хромосом, и только в одном случае обнаружена сбалансированная аутомсомная перестройка (перичентрической инверсия хромосомы 3), клиническая значимость которой осталась окончательно невыясненной. У 2 из 25 (8%) пациенток с XX-дисгенезией гонад обнаружено наличие скрытого мозаицизма по хромосоме Y в одном случае, и скрытой Yp-Xq транслокации с присутствием гена *SRY* в месте терминальной Xq22 делеции перестроенной X-хромосомы. Последний случай свидетельствует о том, что не только транслокации Y-хромосомы с вовлечением локуса *SRY*: могут приводить не только к (SRY-)XY-инверсии пола и Yp+/SRY+ XX-инверсии пола (тестикулярной и овотестикулярной формы), но и к Yp+/SRY+ XX-дисгенезия гонад. У 4 из 25 (16%) пациенток с XX-дисгенезией, у которых были выявлены структурные аномалии гоносом, точки разрыва располагались локусе Xq22.*

3.7. Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с овотестикулярной формой нарушения формирования пола.

В ходе работы обследована группа из 16 пациентов с овотестикулярной формой НФП (табл. 28). Точные сведения о возрасте трех больных отсутствовали, возраст остальных пациентов варьировал от 2 до 19 лет. Все обследованные с овотестикулярной формой НФП не являлись родственниками, однако следует отметить, что больная Э.И., 19 лет являлась родной сестрой пациента Э.М., 12 лет (SRY182), у которого диагностировали SR \bar{Y} -негативную форму XX-инверсии пола (данный семейный случай нарушения дифференцировки пола описан в разделе обследования пациентов с XX-инверсией пола). Среди обследованных 5 пациентов были зарегистрированы и воспитывались в женском, 11 индивидуумов – в мужском поле, при этом в одном случае (пациент AZF772) при рождении пол ребенка был определен как мужской, однако, впоследствии по результатам проведенного комплексного обследования, в том числе медико-генетического обследования, было принято решение изменить пол на женский и провести больному соответствующую хирургическую коррекцию половых органов.

Всем пациентам с овотестикулярной формой НФП проведено цитогенетическое исследование – анализ кариотипа по лимфоцитам периферической крови. Согласно его результатам было установлено, что 12 (75%) пациентов с ОТ НФП имели нормальный женский (46,XX) кариотип, 2 пациента (Ш.Е. и К.Т.) – нормальный мужской (46,XY) кариотип, 1 пациент (Б.Д., An16) имел истинный химеризм 46,XX/46,XY (детально описан в разделе обследования пациентов с кариотипом 46,XX/46,XY) и 1 пациент (С.И., AZF772/SRY225) с кариотипом mos 46,XX[27]/47,XX,+mar[3] являлся мозаиком с нерегулярным маркером гоносомного происхождения. Как было установлено, обнаруженная маркерная хромосома являлась дериватом Y-хромосомы.

С целью идентификации Y-хромосомы, выявления гена *SRY* и других ее последовательностей, обнаружения скрытого мозаицизма проведено обследование 14 из 16 больных с овотестикулярной формой НФП, результаты приведены в таблице 28. Молекулярно-генетическое исследование у пациентов Э.И. и Ш.Е., не было выполнено вследствие недоступности биологического материала.

Данные обследования 16 пациентов с овотестиккулярной формой НФП (истинным гермафродитизмом).

№	Код пациента	Возраст	Пол	Гонады		Кариотип (по лимфоцитам периферической крови)		Локусы			
				слева	справа	SR Y	AMEL Y	AMEL X	AZF		
1	SR Y37	16 лет	Ж	Яичко	овотестис	46, XX	-	-	+	-	-
2	SR Y111	Н.д.	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	+	-	-
3	Д.Д.	13 лет	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	+	-	-
4	Л.Д.*	Н.д.	Ж	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	+	-	-
5	SR Y78	16 лет	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	+	-	-
6	SR Y164	2 г.	Ж	Овотестис	овотестис	46, XX	-	-	+	-	-
7	Э.И.	19 лет	Ж	Яичник	яичко	46, XX	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
8	SR Y157	3 г.	М	Овотестис	овотестис	46, XX	-*	-*	+	+	-*
9	П.Х.У7	Н.д.	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	+	-	-
10	AZF772 (SR Y225)	4 г.	М >Ж	Овотестис	овотестис	mos46, XX[27]/47, XX, +mar[3], ish i(Y)(p10)(DYZ3+, SR Y++) nuc ish (DXZ1×2)[89]/ (DXZ1×2, DYZ3×1)[11]	+	+	+	-	-
11	Ш.Е.	20 л.	М	н.д.	н.д.	46, XY	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
12	К.Т.	18 л.	Ж	Яичник (овотестис?)	яичко	46, XY	+	+	+	+	н.и.
13	Б.Д. (An16)	2 г.	М	Овотестис	овотестис	mos 46, XX[17]/46, XY[33]	+	+	+	+	+
14	SR Y182	12 л.	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	-	-	-
15	SR Y 228	Н.д.	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	-	-	-
16	SR Y46	Н.д.	М	н.д.	н.д.	46, XX	-	-	-	-	-

Примечание: * - кровь и гонады. н.и. – не исследовали.

Молекулярно-генетическое исследование проведено у 13 пациентов на ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови, в одном случае (пациент SRY157) исследовали как лимфоциты периферической крови, так биопсийный материал гонад.

Отсутствие последовательностей, специфичных для короткого плеча (*SRY*, *ZFY* и *AMELY*) и длинного плеча (Yq маркеров, локализованных в регионах AZFa, AZFb и AZFc) Y-хромосомы, обнаружено у всех пациентов с ОТ НФП/ИГ, имевших кариотип 46,XX. Наличие локуса *SRY* и других последовательностей Y-хромосомы обнаружено у одного из двух пациентов, имевших кариотип 46,XY (К.Т.), пациента с химеризмом 46,XX/46,XY, а также мозаика 46,XX/47,XX,+mar. У последнего из них были выявлены только последовательности, специфичные для короткого плеча Y-хромосомы (*SRY*, *ZFY* и *AMELY*). Анализ числа CAG-повторов экзона 1 андрогенового рецептора (*AR/HUMARA*) свидетельствовал о наличии у него гетерозиготности по данному аллелю (25/26). Исследование инактивации X-хромосомы не выявило наличия выборочной инактивации X-хромосом, соотношение инактивации данных аллелей (XCI) составило 40%/60%, соответственно. Данный пациент будет ниже описан нами подробнее.

Клинический случай 8.

Пациент С.И. (AZF772), 3 лет был направлен в ФГБНУ «МГНЦ» для медико-генетического обследования и консультирования по поводу двойственного строения наружных половых органов.

При рождении у пробанда обнаружено интерсексуальное строение наружных половых органов, отсутствие яичек в мошонке, малые размеры полового члена, степень вирилизации наружных гениталий соответствовала III стадии по Прадеру. Ребенок родился от первой доношенной беременности с массой 3200 г и ростом 51 см. Родители пробанда здоровы, не являются родственниками. Исследование сыворотки крови на 17-гидроксипрогестерон - 15 нмоль/л (норма: < 20 нмоль/л) и электролиты: натрий – 135 ммоль/л (130 – 150 ммоль/л), калий – 4,2 ммоль/л (3,0 – 5,5 ммоль/л) позволило исключить наличие врожденной гиперплазией коры надпочечников, обусловленной дефицитом 21-гидроксилазы. По желанию родителей ребенок был зарегистрирован в мужском паспортном поле.

Status genitalis: Наружные половые органы пациента при осмотре имеют

двойственное строение. Гонады при пальпации наружных половых органов и паховых областях не удалось определить. Имеется клиторофаллос с головкой и хорошо развитыми кавернозными телами. Мошонка недоразвита, расщеплена и визуально напоминает большие половые губы, умеренно выражена ее пигментация и складчатость. Отверстие уретры открывается в центре промежности.

Гормоны крови: кортизол – 496 нмоль/л (норма 150-660), 17-гидроксипрогестерон – 1,4 нмоль/л (норма <13), прогестерон – 0,1 нмоль/л (норма <6), тестостерон базальный – 1,3 нмоль/л (норма – 0,07-1,5), тестостерон стимулированный (на фоне стимуляции ХГч) – 5,7 нмоль/л (норма >3,5), эстрадиол – 34 пмоль/л (норма <55). Базальный уровень 17-гидроксипрогестерона, прогестерона, кортизола, тестостерона и эстрадиола соответствовал норме, что позволило исключить нарушение формирования пола надпочечникового генеза. Пациенту был проведен короткий стимуляционный тест с хорионическим гонадотропином (ХГч). После стимуляции отмечен подъем уровня тестостерона до 5,7 нмоль/л.

При эхографии полости малого таза визуализирована высоко расположенная матка величиной 20×9×12 мм с полостью размером 1 мм. Справа и слева от матки визуализированы гонады размерами 20×12×14 мм с анэхогенными структурами, соответствующими фолликулярному аппарату яичника. При диагностической лапароскопии в полости малого таза по срединной линии обнаружена матка размером 6×4 см и две гонады с обеих сторон от матки размером 1,5×1 см. Визуализированы маточные трубы, идущие от гонад по направлению к матке. Гонады состоят из отсеков различной по структуре ткани: 1/3 – светло-коричневого цвета, однородная, 2/3 – белесого цвета с единичными включениями (фолликулами), и визуально соответствуют овотестис. Для окончательного подтверждения овотестикулярного типа строения гонады и определения тактики хирургического лечения выполнена биопсия различных по структуре частей правой гонады с последующим гистологическим исследованием.

Гистологическое исследование выявило наличие дифференцированной овариальной ткани (с примордиальными фолликулами) в правой гонаде и дисгенетичной тестикулярной ткани в левой гонаде (тканью яичка без элементов придатка, каналцы с элементами очаговой субатрофии, в их просвете в 1-2 слоя

недифференцированных клеток), что свидетельствовало о наличии овотестикулярной формы нарушения формирования пола.

Результаты медико-генетического обследования:

Стандартное цитогенетическое исследование позволило выявить у больного С.И. (AZF772) наличие мозаицизма $mos46,XX[27]/47,XX+mar[3]$. С целью установления происхождения маркерной хромосомы и причины нарушения дифференцировки пола проведено молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование. FISH анализ с ДНК-зондами на хромосомы X (DXZ1) и Y (DYZ3, LSI SRY) выполнен на лимфоцитах периферической крови согласно стандартному протоколу (Рис. 42).

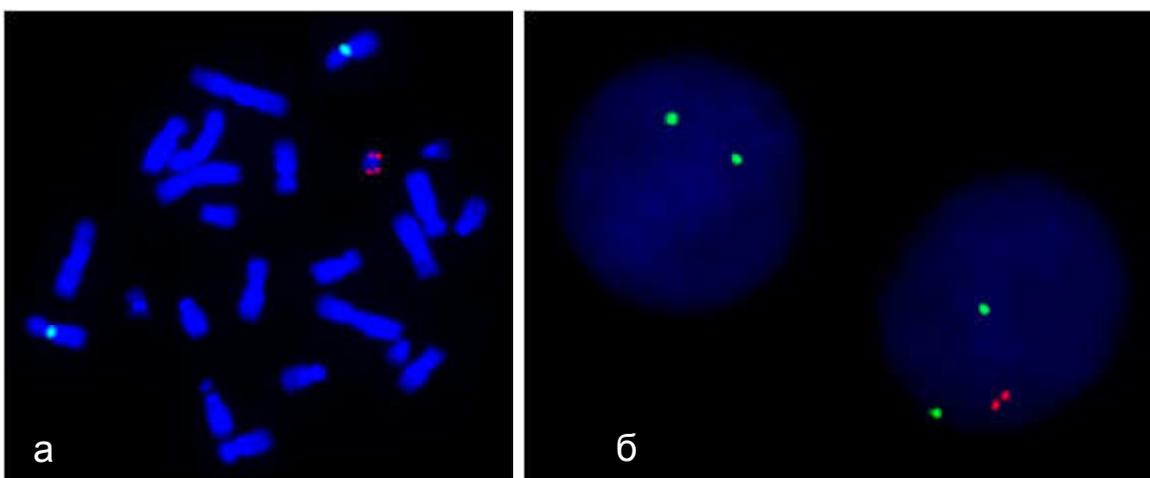


Рис. 42. Результаты анализа FISH с использованием ДНК-проб LSI SRY/CEP X на культивированных лимфоцитах периферической крови пациента С.И. (AZF772):

Примечание: а – фрагмент метафазной пластинки с двумя хромосомами X, несущими зеленый сигнал (локус DXZ1), маркирующий центромерный регион, Xcen и маркерную хромосому (Yp изохромосома) с двумя красными сигналами на Yp11.3 (локус SRY); б – интерфазные ядра лимфоцитов: с двумя копиями DXZ1 (клон 46,XX); двумя копиями DXZ1 и двумя копиями SRY (клон 47,XX,+mar).

Кариотип пациента по результатам цитогенетического обследования:

$mos\ 46,XX[27]/47,XX,mar[3],\ ish\ i(Y)(p10)(DYZ3+, SRY++)$

$nuc\ ish\ (DXZ1\times 2)[89]/(DXZ1\times 2, DYZ3\times 1)[11]$.

При комплексном генетическом исследовании установлено, что маркерная хромосома представляет собой изохромосому Y по короткому плечу (isoYp), обнаруженную в 11% исследованных ядер лимфоцитов. Результаты молекулярного анализа свидетельствовали об присутствии у больного последовательностей короткого плеча (SRY, ZFY и AMELY) и отсутствие исследованных

последовательностей длинного плеча хромосомы Y и подтвердили, что маркерная хромосома является изохромосомой isoYp.

В результате проведенного обследования установлен окончательный диагноз: овотестикулярная форма нарушения формирования пола (ОТ НФП) вследствие гоносомного мозаицизма 46,XX/47,XX,i(Yp). С учетом развития органов половой системы пациенту проведена хирургическая коррекция пола с адаптацией в женском паспортном поле.

Таким образом, в группе пациентов с овотестикулярной формой НФП большинство 12 из 16 (75%) пациентов имели нормальный женский кариотип (46,XX), а Y-хромосома в регулярной (2 пациента) или мозаичной форме (2 пациента) обнаружена у 4 из 16 (25%) больных. Причина аномалии дифференцировки гонад и нарушениям полового развития установлена у 2 из 16 (12,5%) пациентов с ОТ НФП: в случае химеризма XX/XY и гоносомного мозаицизма с наличием нерегулярной SRY-несущей перестроенной хромосомы Y (изохромосомой по короткому плечу Y - isoYp).

Только у одного пациента с ОТ НФП выявлено наличие семейной аномалии формирования пола (у родного брата – XX-инверсия пола), что может свидетельствовать в пользу общности в этиологии данных нарушений дифференцировки гонад у данных sibсов. Вероятно, они могут иметь генную мутацию или микроструктурную перестройку аутосом или хромосомы X, наличие которой привело к развитию данных форм аномалии формирования пола.

3.8. Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с анорхией и монорхией.

С целью выяснения причин нарушения дифференцировки пола, развития тестикулярной ткани и формирования яичек цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование проведено у 25 пациентов, имеющих половые органы, развитые по мужскому типу, но с отсутствием одного или обоих яичек – с диагнозом «монорхия», «анорхия» или «синдром рудиментарных яичек/синдром тестикулярной регрессии». Частота встречаемости одностороннего и двустороннего поражения развития яичек (монорхия или монорхизм) в данной группе пациентов была примерно равной (13/12), составив – 52% и 48%, соответственно (табл. 29).

Среди обследованных пациентов данной группы 6 индивидуумов являлись взрослыми мужчинами (в возрасте от 25 лет до 41 года) и обратились по поводу первичного бесплодия в браке, 19 пациентов – детьми, возраст которых варьировал от 2 мес. до 15 лет. У всех из 5 взрослых пациентов, которым проводили спермиологическое исследование, обнаружена азооспермия, у одного пациента с монорхизмом и первичным бесплодием в браке спермиологический анализ не выполняли из-за недоступности биологического материала для исследования.

За исключением одного семейного случая (пациент Ф.Е.) исследованные случаи являлись спорадическими. Больной Ф.Е. – мальчик 2 лет из двойни после ЭКО, с нарушением формирования пола: отсутствие яичка справа, гипоспадия дистально стволовая форма, состояние после оперативной коррекции. У его брата Ф.Н. также отмечено нарушение формирование пола: крипторхизм слева, дисгенезия/гипоплазия гонады слева (смешанная дисгенезия гонад?), венечная форма гипоспадии, у дяди со стороны отца – также монорхизм и бесплодие. Биологический материал от дяди пробанда был недоступен для исследования. Пациенты Ф.Е. и Ф.Н. – двойня от 1-ой беременности, наступившей после 2-ой программы ЭКО. Первая программа ЭКО закончилась неудачей (отсутствие беременности). В анамнезе у матери пробандов бесплодие в течение 10 лет (сочетанное бесплодие «женский фактор» + «мужской фактор»). У нее были удалены маточные трубы, у отца патозооспермия. Наследственность в семье отягощена по нарушению репродуктивной функции: у бабушки со стороны матери в анамнезе 2 спонтанных аборта в I-триместре беременности.

По результатам стандартного цитогенетического исследования братьев установлены кариотипы с наличием XX/XY мозаицизма:

Ф.Е. (1647Л) - mos 45,X[7]/46,XY[43]; Ф.Н. (1678Л) - Mos 45,X[3]/46,XY[77].

Результаты молекулярно-цитогенетического исследования подвели наличие данного гоносомного мозаицизма в лимфоцитах периферической крови у пациента Ф.Е. (1647Л) (табл. 30), но не обнаружили его у его брата Ф.Н. – 46,XY, nuc ish (DXZ1,DYZ3)×1 [200].

По результатам цитогенетического исследования у 22 из 25 (88%) пациентов с монорхизмом или анорхизмом, установлен нормальный мужской кариотип (46,XY), у 3 (12%) больных аномалии кариотипа. В 2 случаях (AZF621 и Ф.Е.) в лимфоцитах периферической крови обнаружен мозаицизм по хромосоме Y (mos 45,X/46,XY) с наличием мионорного клона 45,X – 15% (пациент Ф.Е.) или преобладающего клона 45,X – 58% (пациент AZF621), в третьем – мозаицизм 46,XY/47,XXY (пациент О.И.).

Молекулярно-цитогенетическое исследование выполнено у 3 больных данной группы (AZF3403, Ф.Е., О.И.). В первом случае с помощью FISH анализа выявлено наличие скрытого низкоуровневого мозаицизма по клону 45,X, во втором – исключено, а в третьем подтверждено наличие явного мозаицизма, соответственно (табл. 29). Таким образом не подтверждено наличие мозаичной формы синдрома Клайнфельтера у пациента О.И., окончательно кариотип определен как немозаичный (46,XY).

Для выявления наличия скрытых перестроек короткого и длинного плеча Y-хромосомы в данной группе пациентов с помощью мПЦР выполняли амплификацию последовательностей гена *SRY* и пары X-Y гомологичных локусов *AMELX/AMELY*, *ZFX/ZFY*, а также Y-специфичных STS-маркеров, локализованных в локусе AZF (регионы AZFa, AZFb, AZFc). У всех из 21 пациента данной группы, которым проведен молекулярный анализ Y-хромосомы, обнаружено наличие гена *SRY* и локусов *AMELX*, *AMELY*, *ZFX* и *ZFY*, что указывает на отсутствие делеции гена *SRY* и/или транслокации с вовлечением короткого плеча Y-хромосомы (табл. 29). Секвенирование кодирующей последовательности гена *SRY*, выполненное у пациента SRY205, не выявило наличия точковых мутаций (табл. 24).

Данные об обследованных пациентах с монорхией или анорхией.

№	код	Возраст	Диагноз	Характер поражения тестикул	Кариотип	Локусы		
						SRY	AMELX/Y	del AZF
1	SR Y6	9 л.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	-
2	SR Y13	4 г.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	-
3	SR Y26	14 л.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	-
4	SR Y47	13 л.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	-
5	SR Y51	2 г.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	-
6	SR Y52	3 г.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	Н.и.
7	Щ.М.	10 лет	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	Н.и.
8	SR Y210	2 мес.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	Н.и.
9	SR Y29	3 г.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	-
10	SR Y205	9 мес.	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	+	+/+	Н.и.
11	SR Y156	10 лет	Монорхия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	Н.и.
12	AZF373	15 лет	Монорхия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	-
13	Л2216	34 г.	Монорхия. Б1, секреторная азооспермия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	b2/b4
14	А.М.	25 л.	Монорхия. Б1	1-стороннее	46,XY	+	+/+	b2/b3
15	AZF2672	28 л.	Монорхия. Б1, секреторная азооспермия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	-
16	AZF3403 (У.А.)	7 лет	Монорхия	1-стороннее	46,XY, nuc ish (DXZ1×1)[2]/ (DXZ1×1, DYZ3×1)[498], т.е. 45,X (0,4%)/ 46,XY(99,6%)	+	+/+	b2/b3

№	код	Возраст	Диагноз	Характер поражения тестикул	Кариотип	Локусы		
						SR Y	AMELX/Y	del AZF
17	AZF621	14 лет	Монорхия, гипоспадия	1-стороннее	mos 45,X[23]/46,XY[1 7]	+	+/+	b2/b4
18	П.С.	14 лет	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	Н.и.	Н.и.	Н.и.
19	2352	8 лет	Монорхия	1-стороннее	46,XY	Н.и.	Н.и.	Н.и.
20	2173	9 лет	Анорхия	2-х стороннее	46,XY	Н.и.	Н.и.	Н.и.
21	Ф.Е. (1647Л)	2г.	Монорхия, гипоспадия дистально стволочная форма, состояние после оперативной коррекции	1-стороннее	mos 45,X[7]/46,XY[43], nuc ish (DXZ1×1) [29]/ (DXZ1,DYZ3)×1 [171]	+	+/+	-
22	М.А.	41 г.	Монорхизм, БП, секреторная азооспермия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	-
23	AZF5000	30 лет	Монорхия. БІ, секреторная азооспермия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	-
24	Сv273	29 лет	Монорхия. БІ, секреторная азооспермия	1-стороннее	46,XY	+	+/+	-
25	О.И.	15 лет	Монорхия, гипогонадизм, гинекомастия	1-стороннее	mos 46,XY(85%)/ 47,XXY(15%), nuc ish (DXZ1,DYZ3)×1 [200]	Н.и.	Н.и.	Н.и.

Примечание: Н.и. – не исследовали. * - точковых мутаций в гене SR Y не обнаружено.

Микроделеции длинного плеча Y-хромосомы обнаружены у 4 из 16 (20%) пациентов данной группы. Во всех случаях делеции располагались в регионе AZFc (локус Yq11.23). У двух из них делеции полностью захватывали данный регион ('полная' делеция AZFc или делеция b2/b4), и у двух частично затрагивая его (делеция b2/b3). Явный мозаицизм по Y-хромосоме выявлен у 2 из 24 (8,3%) пациентов. У 2 из 4 пациентов с микроделециями Y-хромосомы мозаицизм X/X_Y обнаружен. При стандартном цитогенетическом исследовании, еще у одного, также имеющего микроделецию AZFc с помощью молекулярного цитогенетического анализа обнаружен скрытый низкопроцентный гоносомный мозаицизм по клону 45,X.

Два других больных с микроделециями Y-хромосомы (Л2216 и А.М.) – взрослые мужчины с бесплодием без признаков дефицита маскулинизации имели кариотип 46,XY, молекулярно-цитогенетическое исследование им не выполняли из-за недоступности биологического материала. Не исключено, что они также могли иметь скрытый гоносомный мозаицизм.

Особо следует отметить, что у всех пациентов с обнаруженными микроделециями Y-хромосомы, также, как и мозаицизмом X/X_Y отмечали одностороннее или более выраженное с одной стороны нарушения яика – монорхизм (табл. 29). Среди пациентов с врожденным двусторонним отсутствием тестикул - анорхизмом не было выявлено наличия гоносомного мозаицизма, делеций гена *SRY* и регионов AZF.

Полученные результаты исследования, также как данные литературные данные, свидетельствуют о том, что транслокации, делеции или точковые мутации гена *SRY* являются одной из частых причин аномалий формирования пола на уровне дифференцировки гонад. Нарушения начального этапа развития половой системы по мужскому типу ведут дифференцировки клеток тестикулярной ткани, в первую очередь клеток Сертоли, инициирующих формирования извитых семенных канальцев. Делеции и мутации гена *SRY* являются причиной 10-15% случаев дисгенезии гонад при кариотипе 46,XY (синдрома Свайера). Однако, они не связаны с последующими этапами внутриутробного развития яичка и его опускания в мошонку, и не являются причиной антенатальной дегенерации тестикулярной ткани - монорхизма или анорхизма или синдрома рудиментарных

яичек/тестикулярной регрессии. Вероятно, причиной(ами) данных нарушений развития мужской половой системы являются мутации генов, вовлеченных в поддержание развития яичка и, возможно, его гонадулаума в антенатальный период после завершения I-ой (гормонально независимой) стадии развития половой системы у плода – дифференцировки гонад по мужскому типу и прохождения начальных этапов II-ой (гормонально зависимой) стадии, когда в тестикулярно ткани клетки Сертоли и Лейдига, секретируют антимюллеров гормон (АМГ) и мужские половые гормоны, соответственно, что приводит к маскулинизации наружных и внутренних половых органов. Так как у пациентов с анорхией, монорхией или синдромом тестикулярной регрессии не отмечают признаков двойственности развития гениталий, очевидно, что гормонально-зависимое развитие гениталий не было нарушено, по крайней мере в значимой степени.

Важно отметить, что необходимо проводить дифференциальную диагностику анорхии и монорхии от двустороннего и одностороннего крипторхизма, соответственно, а также от других форм НФП, в частности от смешанной дисгенезии гонад (СДГ), когда с одной стороны гонада может быть представлена тестикулом, с другой тяжевидной (стрек) соединительно-тканной структурой. Очевидно, что мофологически (фенотипически) варьибельный синдром тестикулярной регрессии (синдром рудиментарных яичек) является одной из форм тестикулярной дисгенезии, подтверждению этому служит описанный выше семейный случай нарушения формирования пола, связанной с дефектом развития тесикул у двух братьев Ф.Е. и Ф.Н. У обоих из них помимо нарушения развития яичка также отмечали и другие признаки дефицита маскулинизации, в частности гипоспадию. Особенно трудна дифференциальная диагностика может быть в случаях выраженной гипоплазии высокорасположенных тесикул. Также следует учитывать, что у обследованных нами пациентов мы не исследовали ткань гонад, поэтому нельзя исключить у них наличие межтканевого и/или гонадного мозаицизма по хромосоме Y и/или делеции, либо мутации гена *SRY*. По-видимому, что причиной тестикулярной регрессии являются генетические мутации, не нарушающие дифференцировку гонад по мужскому типу и раннее развитие тестикулярной ткани полностью, а «мягкие» мутации, приводящие к нарушению дальнейшего развития мужской гонады. Согласно полученным нами данным одной

из относительно частых таких причин является мозаицизм по хромосоме Y, в частности 45,X/46,XY. Данный тип гоносомного мозаицизма характеризуется широчайшей фенотипической вариабельностью в отношении формирования пола и развитии органов репродуктивной системы.

Таким образом, мутации хромосомы Y (явный или скрытый мозаицизм и/или микроделеции Yq11.23) обнаружены у 20,8% больных с анорхией/монорхией. У пациентов с данной формой развития гонад не обнаружено делеций гена SRY, у 20% выявлено наличие несбалансированных структурных перестроек Y-хромосомы – микроделеций ее длинного плеча в локусе Yq11.23 (регион AZFc). При этом, по крайней мере, в 2 из 4 случаев наличие микроструктурной перестройки сопровождалось мозаицизмом по хромосоме Y. Частоты встречаемости одностороннего и двустороннего поражения развития яичек (монорхии и анорхии) у пациентов с синдромом тестикулярной регрессии примерно равны (52% : 48%).

У всех пациентов с синдромом тестикулярной регрессии, у которых выявлены мутации хромосомы Y, отмечали односторонний характер поражения гонад (монорхия). При анорхизме не обнаружено мутаций половых хромосом. Среди пациентов с односторонним нарушением развития яичек мозаицизм и/или микроструктурные перестройки Y-хромосомы обнаружены в 5 из 13 случаев.

3.9. Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с XX-инверсией пола.

В группу пациентов с XX-инверсией пола включены 69 больных, из них 28 детей и 41 взрослый, возраст которых варьировал от 1 мес. до 17 лет и от 18 до 52 лет, соответственно. Соматический пол и паспортный пол у всех индивидуумов при рождении был определен как мужской. Причиной обращения для медико-генетического обследования у детей являлось нарушение полового развития, вызванное недостаточностью маскулинизации различной степени (от изолированной гипоспадии до двойственного развития гениталий), а у взрослых пациентов – первичный гипогонадизм и/или первичное бесплодие, азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени.

При проведении стандартного цитогенетического исследования не обнаружено наличия Y-хромосомы или ее материала в регулярной или мозаичной форме. Кариотипы обследованных пациентов по данным стандартного цитогенетического исследования: 46,XX (n=62), 46,XX, fra(16)(q22) (n=1), mos 45,X/46,XX (n=3), 45,X (n=2), 45,XX, der(13;14)(q10;q10) (n=1) (табл. 30). В последнем случае у мужчины (Г.М.) XX-тестикулярной формой НФП в кариотипе дополнительно обнаружена сбалансированная аутосомная перестройка – Робертсоновская транслокация 13;14 (рис. 43).

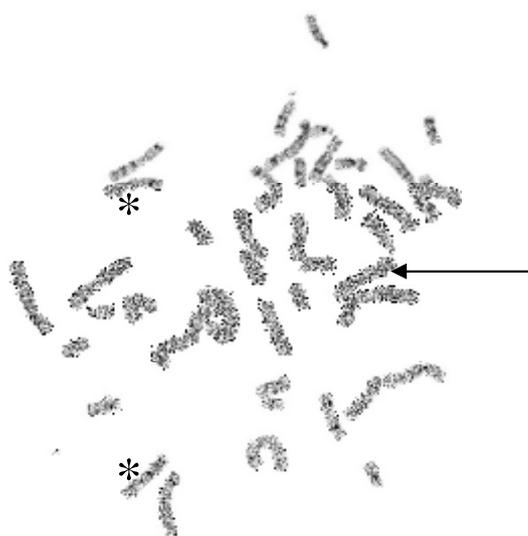


Рис. 43. Препарат метафазной пластинки культивированных лимфоцитов пациента Г.М. (GTG-окрашивание). Дериватная хромосома, der(13;14) указана стрелкой, две хромосомы X помечены звездочками (*).

Таблица 30

Результаты цитогенетического и молекулярно-генетического обследования у 50 пациентов с XX-инверсией пола.

Карิโอтип	Кол-во больных	Маскулинизация гениталий		Наличие (+)/ отсутствие (-) локусов Y-хромосомы						
		полная	неполная	SR Y		AMELY		AZFa,b,c		
				+	-	+	-	+	-	
46,XX	42	31	11	34	8	-	42	-	42	-
45,XX,der(13;14)(q10;q10) ¹	1	1	-	1	-	1	-	-	-	1
45,X:	2	2	-	2	-	-	2	-	-	2
45,X/45,X,der(X)t(X;Y) ^{2,3}										
45,X,der(22)t(Y;22)(p11;p12) ²										
mos 46,XX/46,XY ²	1	-	1	1	-	1	-	1	-	-
mos 45,X/46,XX	3	1	2	3	-	-	3	-	-	3
mos 45,X/46,XX/47,XXX ³	1	1	-	1	-	-	1	-	-	1
Всего:	50	36	14	42	8	2	48	-	49	-

Примечание: 1 – с помощью FISH-анализа выявлен мозаицизм по дериватной (SR Y-несущей) X-хромосоме ;

2 – карิโอтип по данным стандартного цитогенетического исследования был первично определен как 45,X;

3 – карิโอтип по данным стандартного цитогенетического исследования был первично определен как 46,XX.

У некоторых пациентов цитогенетический анализ был выполнен неоднократно, в том числе у 2 пациентов повторное исследование позволило обнаружить мозаицизм 45,X/46,XX, у одного – 46,XX/46,XY. В последнем случае мозаицизм по хромосоме Y подтвержден результатами ПЦР. FISH-анализ на лимфоцитах периферической крови с использованием локус-специфичного зонда LSI SRY (SpectrumOrange) и CEPX (SpectrumGreen) (рис. 44, 45) выполнен у 10 пациентов данной группы: 7 46,XX-мужчин (AZF708, AZF1089, AZF2268, SRY33, SRY245, SRY267, К.С.), мужчины с кариотипом 45,XX,der(13;14)(q10;q10) (AZF998), и у 2 мужчин с кариотипом 45,X (SRY152 и М.А.).

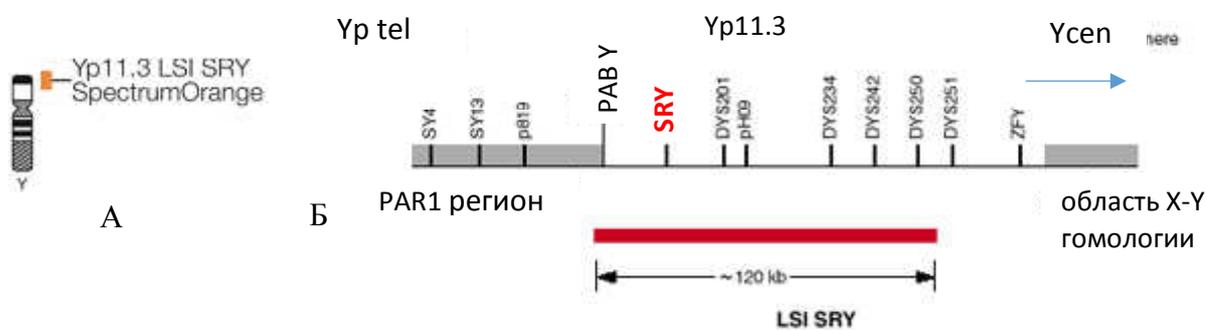


Рис. 44. Локализация области гибридизации на Y-хромосоме пробы LSI SRY.

Примечание: А. Ген *SRY* расположен в локусе Yp11.3 в 10 т.п.н. от PAB, проксимальной границы PAR1 региона. Б. ДНК-проба LSI SRY специфична к последовательности гена *SRY* и прилегающим к нему фланкирующим областям Y-хромосомы, размер которых составляет примерно 120 т.п.н.

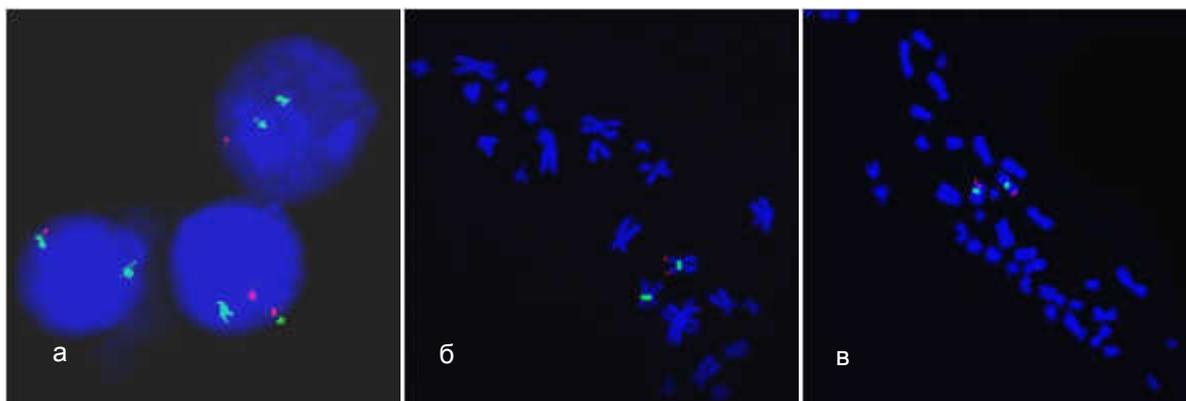


Рис. 45. Результаты FISH анализа с ДНК-пробами LSI SRY (SpectrumOrange) и CEPX (SpectrumGreen) у мужчины (SRY234) с кариотипом 45,XX,der(13;14)(q10;q10). Примечание: Интерфазные ядра с 1-2 копиями SRY и 2 копиями DXZ1 (а). Фрагменты метафазных пластинок, на которых присутствуют 1 (б) и 2 (в) SRY-несущие хромосомы X.

У 9 пациентов с XX-инверсией пола с помощью FISH обнаружена скрытая транслокация фрагмента короткого плеча Y-хромосомы (Yp11) на терминальную часть короткого плеча хромосомы X (Xp22) (рис. 45) и у одного пациента (М.А.) – на короткое плечо хромосомы 22 (22p12). В последнем случае кариотип по результатам молекулярно-цитогенетического исследования определен как:

45,der(22)t(Y;22)(p11;p12),ish der(22)(p11;p12)(DXZ1+SR Y+)[20],
nuc ish(DXZ1×1)(SR Y×1)[20].

У пациента К.С. с кариотипом 46,XX, имеющего дефицит маскулинизации (гипоспадию, крипторхизм), с помощью молекулярно-цитогенетического исследования выявлен скрытый мозаицизм по хромосоме Y, mos46,XX(85%)/47,XXY(15%) – редкий цитогенетический вариант синдрома Клайнфельтера и овотестикулярной формы НФП (истинного гермафродитизма). Кроме того, FISH анализ позволил выявить наличие скрытого мозаицизма по дериватной *SR Y*-несущей X-хромосоме у 3-х пациентов: двух XX-мужчин с полной маскулинизацией: пациенты П.В. (AZF708) и Г.М. (SR Y234/AZF998), а также у 45,X мальчика с XX-инверсией пола (SR Y152).

С целью выявления скрытых структурных (микроструктурных) гоносомых перестроек у пациентов с XX-инверсией пола с помощью мПЦР выполняли анализ последовательностей гена *SR Y* и других Y-специфичных маркеров короткого и длинного плеча хромосомы Y, в качестве контроля проводили анализ X-Y гомологичных последовательностей. Определяли наличие последовательностей, специфичных для короткого плеча Y-хромосомы: *SR Y* (sY14) и *AMELY* (sY70) и гомологичного гена *AMELX* (Xp22). Псевдоген амелогенина (Y-копия гена амелогенина) локализован на карте референсной хромосомы Y в средней части ее короткого плеча (локус Yp11.2), а в случае парацентрической транслокации между повторами IR3 в проксимальной части короткого плеча хромосомы Y (локус Yp11.1).

Нами были исследованы образцы ДНК от 50 пациентов с XX-инверсией пола (табл. 30). Последовательность гена *AMELX* была амплифицирована во всех случаях, что свидетельствовало о правильности проведения ПЦР. Фрагменты Y-хромосомы обнаружены у 43 из 50 (86%) пациентов с XX-инверсией пола. При этом у 41 пациента обнаружена только последовательность гена *SR Y*, а у двух – *SR Y* и *AMELY*.

Наличие гена *SRY* при отсутствии локуса *AMELY* расценивали как транслокацию материала Yp11, на предположительно хромосому X. Однако, в одном случае – у мужчины с кариотипом 45,XX,der(13;14)(q10;q10), у которого с помощью FISH анализа обнаружена «классическая транслокация» фрагмента Yp11 в дистальную область короткого плеча хромосомы X (рис. 45б, 45в), выявлено наличие обеих последовательностей (*SRY* и *AMELY*). Как было впоследствии установлено, в данном случае точка разрыва располагалась в локусе Yp11.2.

Таким образом, у 42 из 50 (84%) обследованных установлено наличие Yp-позитивной (транслокационной) формы XX-инверсии пола (табл. 30). Ген *SRY* присутствовал в геномной ДНК у 34 индивидуумов с кариотипом 46,XX, а также у всех пациентов с XX-инверсией пола, у которых выявлены другие кариотипы. При этом у одного 46,XX пациента (*SRY75*) с неполной маскулинизацией обнаружены все исследованные Y-специфичные последовательности, что свидетельствует о наличии в данном случае скрытого мозаицизма по хромосоме Y, что показано при повторном цитогенетическом исследовании (кариотип 46,XX/46,XY). У всех остальных пациентов с XX-инверсией пола, которым проведено молекулярно-генетическое исследование, обнаружено отсутствие всех анализированных Yq специфичных локусов. У большинства (9 из 10 пациентов) наличие мужского фенотипа было обусловлено микроструктурной перестройкой гоносом (Xp;Yp транслокации) и только в одном – ‘скрытой’ Y-аутосомной транслокацией, что свидетельствует о редкой встречаемости последних при XX-инверсии пола и синдроме 46,XX-мужчина.

Другие исследователи также сообщали редкие случаи ‘скрытых’ Y-аутосомных транслокаций над у пациентов с 46,XX-инверсией пола, а также регулярной моносомии X (кариотипа 45,X) у мужчин. В большинстве случаев выявлены транслокации материала Y-хромосомы на хромосомы 5, 14, 15, 18 и 22 [Hsu, 1994].

При этом помимо гипогонадизм, возможно проявление признаков СШТ, а в случае дисбаланса по материалу аутосомом возможны соответствующие фенотипические признаки (пороки развития, задержка психомоторного развития), у взрослых мужчин отмечают бесплодие вследствие азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени.

У 14 из 50 (28%) обследованных нами пациентов с XX-инверсией пола

наблюдали признаки неполной маскулинизации различной степени выраженности (от гипогонадизма до признаков, характерных для двойственного полового развития) (Табл. 31).

Таблица 31

Выраженность маскулинизации у 50 пациентов с SRY+ (n=42) и SRY- (n=8) XX-инверсией пола.

Пациенты с XX-инверсией пола	SRY (+)		SRY (-)	
	Нормальная маскулинизация	Недостаточная маскулинизация	Нормальная маскулинизация	Недостаточная маскулинизация
Взрослые	28	1	3	-
Дети	5	8	-	5
Всего:	33	9	3	5

Ниже будут описаны случаи наиболее значимые клинические случаи медико-генетической диагностики XX-инверсии пола.

Клинический случай 9.

Пациент П.В. (AZF708), 37 лет, обратился для медико-генетического обследования и консультирования по поводу первичного бесплодия в браке в течение 12 лет. На момент осмотра: Рост 160 см, вес 74 кг. До начала андроген-заместительной терапии (начатой за 1 год до момента обследования) вес пациента составлял 82 кг. Больной имел нормостеническое телосложение, наружные половые органы, сформированные по мужскому типу, без признаков недостаточности маскулинизации. Гипоплазированные яички (объемом 2 мл каждое) находились в мошонке, половой член и мошонка – без изменений. Рост волос на лице, подмышечных впадинах и лобке скудный. Отмечено наличие невыраженной гинекомастии. Интеллект пациента нормальный.

По результатам УЗИ органов малого таза у пациента обнаружена предстательная железа нормальных размеров, а также семенные пузырьки без видимых изменений.

Спермиологическое исследование было проведено многократно, при этом наблюдали прогрессирующее ухудшение показателей спермограммы: выраженное

снижение концентрации сперматозоидов до олигозооспермии тяжелой степени (0,15 млн/мл), а затем вплоть до азооспермии.

Исследование гормонов сыворотки крови свидетельствовало о наличии гипергонадотропного гипогонадизма. Концентрация гонадотропных гормонов (ЛГ и ФСГ) повышена: 13,5 мМЕ/мл (норма 0,8–8,4 мМЕ/мл) и 26,9 мМЕ/мл (норма 1,0–11,8 мМЕ/мл), соответственно. Уровень тестостерона снижен – 10,1 нмоль/л (норма 12,1–38,3 нмоль/л), пролактин – в пределах нормы 415 мМЕ/л (норма 105–540 мЕ/л).

Результаты медико-генетического обследования:

Кариотип по данным стандартного цитогенетического исследования: 46,XX[11]. Результаты FISH анализа с пробамми LSI SRY/CEP X выявили наличие скрытой транслокации терминальной части короткого плеча Y-хромосомы (Yp11-Ypter) в дистальную часть короткого плеча хромосомы X. Кроме того, FISH анализ позволил обнаружить наличие скрытого сложного мозаицизма с присутствием трех SRY-позитивных линий клеток, несущих одну, две и три хромосомы X: 45,X(SRY×1), 46,XX(SRY×1) и 47,XXX (SRY×2). Кариотип пациента П.В. (AZF708) по результатам цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования:

46,XX, ish der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3)(SRY+,DXZ1+),

nuc ish(DXZ1×2,SRY×1)[474]/(DXZ1×1,SRY×1)[19]/(DXZ1×3;SRY×2)[7].

Результаты молекулярно-генетического исследования подтвердили присутствие фрагмента короткого плеча Y-хромосомы, включая локусы *SRY*, *ZFY* и отсутствие локуса *AMELY* (Yp11.2). Картирование точек разрыва свидетельствовало об их расположении между маркерами sY1219 и *AMELY*. Проведенное у пациента и у его матери исследование гена андрогенового рецептора (*AR*) показало наличие у пробанда двух аллелей, несущих 18 и 23 CAG-повтора в экзоне 1. Мать пробанда, как было установлено, являлась гомозиготной по аллелю, несущему 18 CAG повторов. Анализ инактивации X-хромосомы позволил выявить неслучайный характер лайонизации (XCI 95:5%) у данного пациента, при этом отмечали избирательную инактивацию материнской X-хромосомы и активность отцовской (SRY-несущей) X-хромосомы.

Ниже будет описан другой случай (Y+)XX-инверсии пола с мозаицизмом с наличием двух XX-клонов: 1) с одной нормальной и одной SRY+ дериватной хромосомой; 2) с двумя SRY+ X-дериватными хромосомами.

Клинический случай 10.

Пациент Г.М. (SRY234/AZF998), 27 лет, обратился для медико-генетического обследования и консультирования по поводу первичного бесплодия в браке. Пробанд родился от II-ой беременности, матери к моменту рождения было 29 лет. От I-ой беременности, наступившей у матери в возрасте 25 лет, родилась девочка. Сестра пробанда, 33 года, здорова, состоит в браке, имеет здоровую дочь 14 лет.

Данные осмотра: рост - 164 см, вес 62 кг. Телосложение маскулинное. Характер оволосения и развитие половых органов по мужскому типу, соответственно возрасту; гипоплазия яичек. Интеллект не нарушен.

Данные исследования гормонов крови: ЛГ – 19,35 мМЕ/л (норма – 1,50-9,30 мМЕ/л), ФСГ – 27,65 мМЕ/л (норма – 1,40-18,10 мМЕ/л), пролактин – 11,0 нг/мл (2,1-17,7 нг/мл), тестостерон – 377,83 нг/дл (норма – 286,00 – 1511,00 нг/дл).

Данные УЗИ половых органов: предстательная железа размером 31×35×36 мм, объемом 19,5 см³. Семенные пузырьки размером 0,9 см. Яички имеют овальную форму, четкий, ровный контур. Паренхима тестикулярной ткани однородна и средней эхогенности. Белочная оболочка – тонкая непрерывная полоска эхогенной интенсивности по краю яичка толщиной до 1 мм. Средостение яичек высокоэхогенно, имеет вид полосы в верхних отделах яичка. В тестикулярной ткани с обеих сторон присутствуют кальцинаты размером менее 1 мм, которые неравномерно распределены в объеме. Размеры яичек: правое – 31×18×10 мм, объемом 2,8 см³, левое - 26×15×11 мм, объемом 2,1 см³. Придатки яичек имеют однородную структуру, среднюю эхогенность. Головка придатка без особенностей с обеих сторон. Семенной канатик толщиной 1 мм (слева и справа); гроздьевидное сплетение слева – толщина вен до 1,8 мм, при натуживании рефлюкса нет. В мошоночной области незначительное количество свободной жидкости (вариант нормы). Заключение: Гипоплазия яичек. Микрокальциноз яичек. Размеры и объем яичек соответствуют возрасту 12 лет. По результатам

неоднократного спермиологического обследования диагностирована секреторная азооспермия.

Результаты медико-генетического обследования:

Данному пациенту проведено комплексное цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование. Кариотип больного по данным стандартного цитогенетического исследования: 45,XX,der(13;14)(q10;q10), что свидетельствовало о наличии синдрома 46,XX-мужчина с сочетанием с Робертсоновской транслокацией с вовлечением хромосом 13 и 14, происхождение которой осталось невыясненным из-за недоступности для исследования биологического материала от родителей пациента (рис. 43).

Проведение флюоресцентной гибридизации *in situ* позволило обнаружить наличие фрагмента Yp11, транслоцированного на терминальную часть короткого плеча X-хромосомы (локус Xp22.3), а также выявить наличие мозаицизма с присутствием двух линий клеток, несущих ген *SRY* на одной из двух хромосом X (92%) и на обеих хромосомах X (8%) (рис. 45).

При проведении молекулярно-генетического обследования у пациента Г.М. обнаружены последовательности короткого плеча Y-хромосомы: *SRY* и *ZFY* (Yp11.3), *AMELY* (Yp11.1). Последовательности, специфичные для длинного плеча Y-хромосомы, не обнаружены. Результаты картирования точки разрыва в Yp11 будут приведены ниже.

Заключительный диагноз: XX-тестикулярная форма НФП (синдром де ля Шаппеля), Робертсоновская транслокация (13;14). Гипергонадотропный гипогонадизм, первичное бесплодие, секреторная азооспермия.

Данный случай синдрома 46,XX-мужчина необычен по ряду причин: 1) наличие 'необычного' мозаицизма по хромосоме X; 2) уникальная точка разрыва в коротком плече Y-хромосомы с сохранением локуса *AMELY*; 3) комбинация с Робертсоновской транслокацией (очевидно случайное совпадение двух структурных перестроек, затрагивающих пару аутосом (хромосомы 13 и 14) и половых хромосом (X и Y)). Очевидно, что транслокация фрагмента Yp11 на дистальную часть Xp22.3 у данного пациента является результатом аномальной рекомбинации между хромосомами X и Y в ходе профазы I мейоза в сперматогенезе отца. Наиболее вероятный механизм обнаруженного гоносомного мозаицизма

обусловлен возникновением дополнительных мутаций: нерасхождением сестринских хроматид *SRY*-несущей дериватной хромосомы X в мейозе II, что привело к возникновению зиготы с генотипом $47,XX^{SRY+}X^{SRY+}$, а также последующей селективной постзиготической потере в части клеток материнской и одной из отцовских хромосом X (нормальной и дериватной X-хромосом, соответственно) с образованием двух обнаруженных у больного линий клеток.

Клинический случай 11.

Пациент А.А. (SRY152), мальчик 6 мес. направлен на медико-генетическое обследование в связи с наличием аномалий развития и прогрессирующей гидроцефалии. Пробанд родился от второй беременности, первых родов. Мать, 25 лет, во время беременности в женской консультации не наблюдалась, не обследована, гражданка республики Молдова. Сведений об особенностях течения беременности нет, мать отказалась от ребенка в родильном доме. Отец ребенка не известен. Роды в срок, кесарево сечение, ягодичное предлежание плода. Ребенок родился в асфиксии (оценка по шкале Апгар – 4/7 баллов) с массой 3160 г, длиной 48 см.

При осмотре после рождения выявлено значительное увеличение размеров черепа за счет гидроцефалии (рис. 46а). Окружность головы 40 см при окружности груди 33 см, расхождение швов черепа до 1 см, размер большого родничка 5х5 см, малого – 3х3 см. Также были отмечены: мацерация кожных покровов, укорочение верхних и нижних конечностей, стоп и кистей, микроаномалии развития (короткая шея, запавшая переносица, низко посаженные ушные раковины, остроконечная форма ушной раковины справа). Наружные половые органы пациента сформированы по мужскому типу, яички располагались в мошонке (рис. 46б).



Рис. 46. Фото пациента А.А. с кариотипом 45,X (SRY152).

а) лицо пациента; наглядно видны признаки гидроцефалии;

б) наружные половые органы; отчетливо видна мацерация кожных покровов.

При ультразвуковом исследовании головного мозга в возрасте 1,5 месяцев у пациента выявлена алобарная голопроэнцефалия (слияние желудочков на уровне передних рогов, расширение цистерн мозга, отсутствие полости прозрачной перегородки, агенезия мозолистого тела, септо-хиазмальная дисплазия). Борозды коры мозга не визуализировались, справа от бокового желудочка выявлено кистовидное образование. При рентгенографии грудной клетки в возрасте двух недель выявлено увеличение вилочковой железы. При УЗИ органов брюшной полости патологии не выявлено.

В возрасте 6 месяцев у ребенка наблюдали грубое отставание психомоторного развития, мышечный гипертонус, компрессионную атрофию зрительного и слухового нервов.

Результаты медико-генетического обследования:

По данным стандартного цитогенетического исследования, выполненного на лимфоцитах периферической крови, кариотип пациента (SRY152) определен как 45,X. Однако при анализе метафазных пластинок, окрашенных с помощью G- и C-методов, отмечено некоторое различие в размере X-хромосомы в разных метафазных пластинках (рис. 47). Учитывая этот факт, а также необычность обнаруженной у пациента мужского пола гоносомной аномалии, выполнено комплексное молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование (рис. 48). По результатам молекулярно-цитогенетического исследования выявлен мозаицизм по перестроенной хромосоме X, несущей

фрагмент короткого (с геном *SRY*) и длинного (часть гетерохроматина Yq12) плеча Y-хромосомы. Кариотип пациента повторно определен как:

mos 45,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3?q12)[41]/45,X[9].

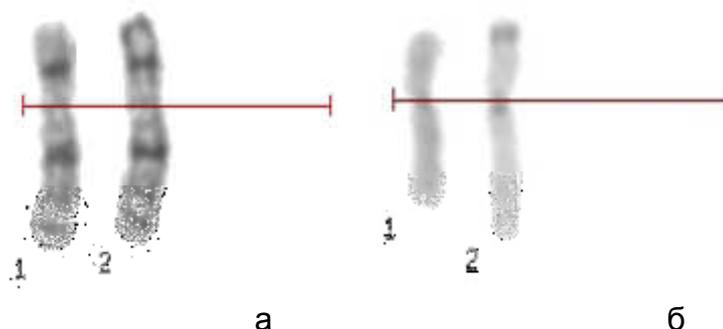


Рис. 47. X-хромосомы пациента А.А. (*SRY*152) с кариотипом 45,X из перепаратов метафазных пластинок, приготовленных с помощью методов G- (а) и С-окрашивания (б). 'Нормальная' (1) и 'аномальная' (2) X-хромосомы.

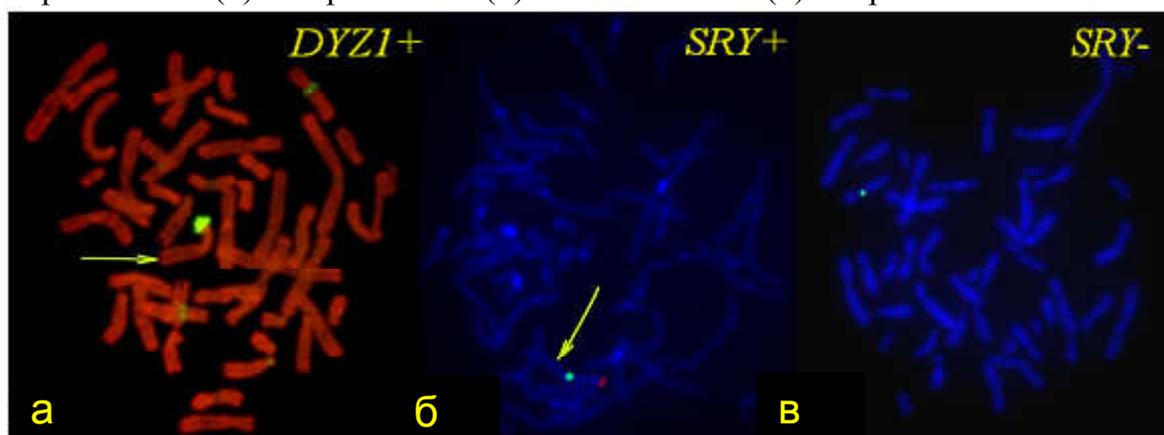


Рис. 48. Результаты метафазного FISH-анализа у пациента А.А. (*SRY*152) 45,X. Выявлен скрытый мозаицизм по дериватной (*SRY*-несущей) хромосоме X: а) флюоресцентная *in situ* гибридизация с ДНК-зондом на гетерохроматиновую область Yq12 (*DYZ1*); б и в - флюоресцентная *in situ* гибридизация с ДНК-пробой на центромерную область хромосомы X (*DXZ1*, зеленый цвет) и локус-специфичной пробой на ген *SRY* (*LSI-SRY*, красный цвет), слева (б) фрагмент метафазы с перестроенной хромосомой X (*SRY*+), справа (в) с интактной хромосомой X. Дериватная хромосома X указана стрелкой.

При ПЦР анализе последовательностей половых хромосом выявлено наличие в геномной ДНК пациента фрагментов короткого плеча X-хромосомы (локусы *AMELX*, *ZFX*), а также подтверждено наличие фрагмента короткого плеча Y-хромосомы (*SRY*, *ZFY*, *sY2062* и *sY1248*) и не обнаружено последовательностей,

специфичных для эухроматина длиного плеча: регионы AZFa, AZFb, AZFc/Yq11.21-q11.23 (рис. 49).

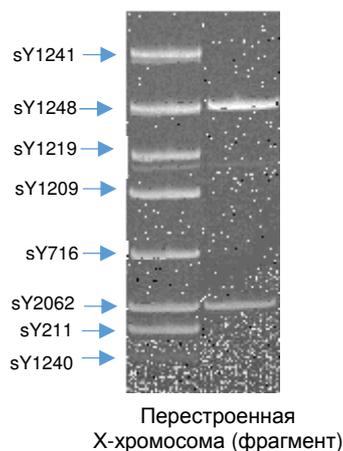


Рис. 49. Гель-электрофорез продуктов ПЦР амплификации у пациента А.А. (SRY152). 1, контрольная ДНК (фертильный 46,XY мужчина), 2, пациент А.А. (SRY152), имеющий мужской фенотип и кариотипом 45,X. Слева указаны Y-специфичные STS-локусы.

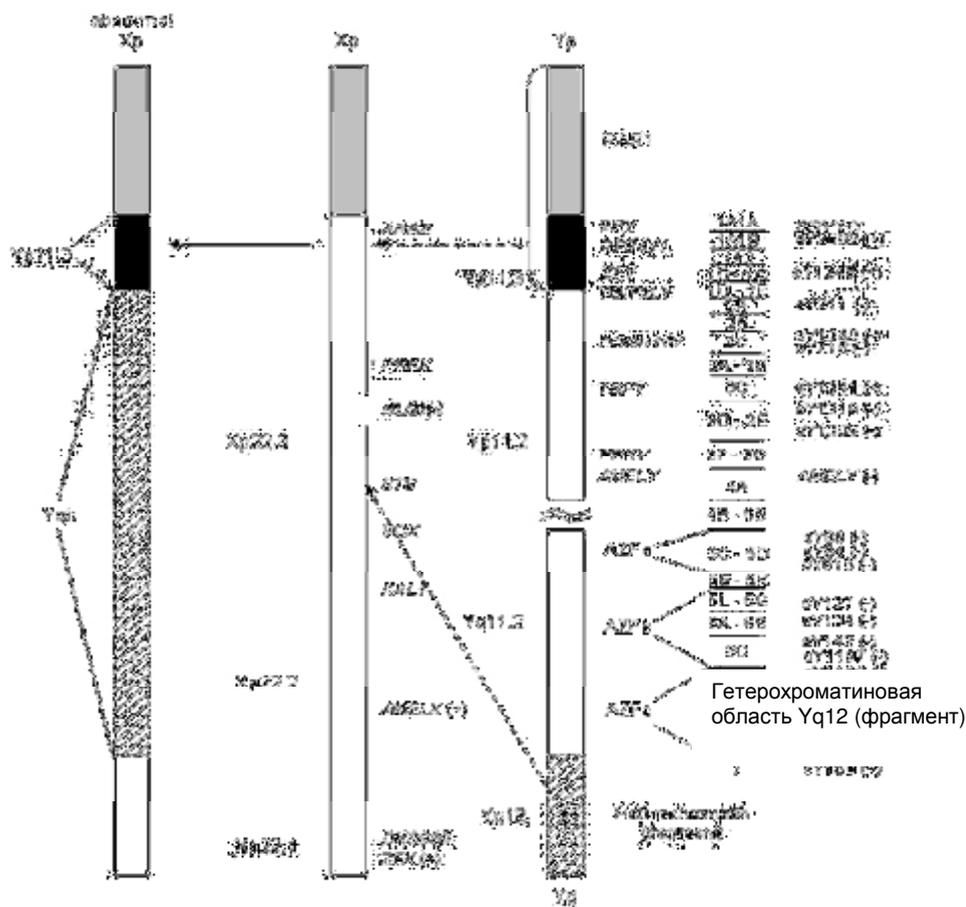


Рис. 50. Схематичное изображение образования X-Y деривата (слева), несущего транслоцированный фрагмент короткого плеча Y-хромосомы (Yp). В центре показан фрагмент короткого плеч нормальной хромосомы X, а справа фрагменты короткого и длинного плеча хромосомы Y, транслоцированные на короткое плечо

хромосомы X (их перенос обозначен пунктирными линиями). Слева от фрагментов хромосом X и Y указаны цитогенетические локусы, справа – положение некоторых регионов (PAR1, AZF), генов и маркеров. Справа указаны делеционные интервалы (1-7) и исследованные STS-маркеры Y-хромосомы. Обозначением (+) показано присутствие, (-) – отсутствие исследованных локусов Yp. Масштаб X- и Y-хромосом не соблюден.

Точка разрыва располагалась в коротком плече Y-хромосомы в локусе Yp11.3 в интервале 1B–2A между маркерами sY1248 (+) и sY211 (-) (рис. 49, 50). Наличие фрагмента MSY региона, включающего делеционный интервал I хромосомы Y, позволяет отнести данного пациента к первому классу (Yp+) XX-мужчин.

Уточняющее картирование точек разрыва в X-хромосоме выполнить не удалось, так как у пациента обнаружена гами-/гомозиготность по всем исследованным ее локусам, а также из-за наличия мозаицизма и сложности обнаруженной перестройки. Предположительно точка разрыва располагалась в Xp22.3 в области локализации гена *STS*, делеции которого характерны для X-сцепленного ихтиоза и синдрома протяженной делеции данного локуса.

С целью выявления происхождения данной гоносомной аномалии проведен анализ гетерозиготности X-хромосомы. Результаты молекулярного анализа 8 STR-маркеров DXS6803, DXS9896, DXS1062, DXS1192, STR44, STR45, STR49, STR50 X-хромосомы и CAG-полиморфизма в экзоне 1 гена андрогенового рецептора (*AR/HUMARA*) свидетельствовали о наличии гемизиготности/гомозиготности по хромосоме X (рис. 51).

Наиболее вероятным механизмом возникновения выявленной у пациента А.А. (SRY152) перестройки является аномальная X-Y рекомбинация, возникшая в ходе мейоза у отца. К сожалению, родители пациента не были доступны для обследования. Не исключено, что у отца могла иметься какая-либо перестройка, которая бы предрасполагала к данной сложной транслокации/инсерции материала короткого и длинного плеча Y-хромосомы на X-хромосому. Другим необычным аспектом выявленной аномалии является 'необычный' гоносомный мозаицизм, который не был описан ранее у пациентов с кариотипом 45,X и XX-инверсией пола.

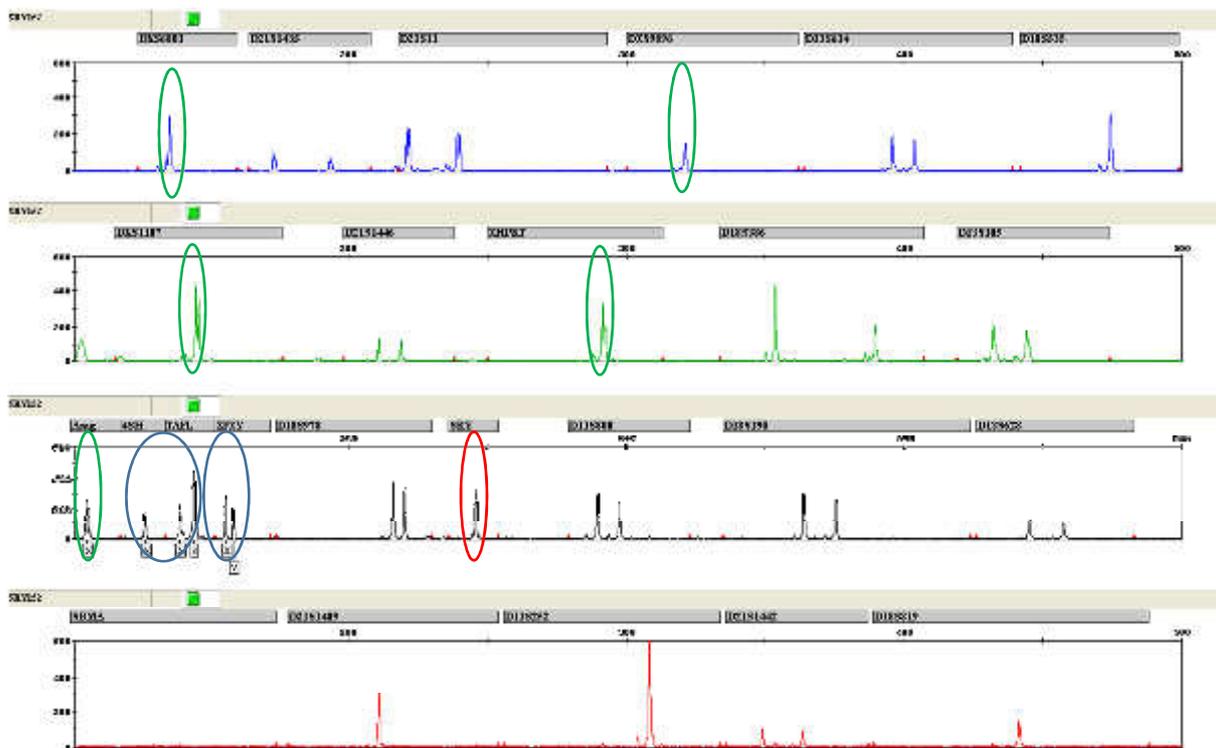


Рис. 51. Результаты КФ-ПЦР у пациента с кариотипом 45,X/45,X,der(X),t(X;Y). Маркеры хромосом X и Y указаны обведенными цветными эллипсами: зелеными, и красным, соответственно. Синими указаны маркеры, измененное соотношение которых указывало на наличие моносомии X (отношение сигналов TAFL хромосомы 3 и X – 2:1, все маркеры X представлены 1 пиком), а также мозаицизма по количеству материала Y-хромосомы (отношение сигналов ZFX>ZFY). Аутосомные маркеры представлены в 1 или 2 копиях.

По-видимому, мозаицизм по перестроенной хромосоме возник в результате постзиготического нерасхождения половых хромосом (нормальной и перестроенной X) у эмбриона на ранних стадиях развития. Наиболее вероятно, что зигота имела генотип $46, XmatXpat(SRY+)$, а выборочная потеря разных хромосом X, наподобие той, которая имеет место при феномене «восстановление из трисомии».

Выявленная структурная перестройка является сложной, уникальной. В литературе описаны единичные случаи обнаружения кариотипа 45,X с наличием X-Y транслокации у пациентов с фенотипически мужским полом (Weil *et al.*, 1993; Stuppia *et al.*, 1999). Данную аномалию гоносом можно рассматривать как редкий вариант XX-инверсии пола (XX-тестикулярной формы НФП). Очевидно, что развитие половой системы по мужскому типу у данного пациента обусловлено наличием гена *SRY* в преобладающем количестве клеток (по данным исследования

лимфоцитов). К сожалению, для генетического исследования у данного пациента была доступна только кровь, поэтому нам не удалось оценить мозаицизм в других тканях.

Помимо фенотипически нормальных мужских половых органов у пациента А.А. отмечена короткая шея, а также укорочение конечностей, стоп и кистей, что может быть отнесено к проявлениям фенотипа синдрома Шерешевского-Тернера. Наличие ихтиоза указывает на нарушение раполагающегося в локусе Хр22.31 гена стероидной сульфатазы (*STS*), делеции или мутации которого связаны с X-сцепленным ихтиозом (ОМIM*300747). Определяющим в клинической картине ребенка является наличие тяжелой внутриутробной гидроцефалии, приведшей к множественным неврологическим нарушениям. К сожалению, отсутствие сведений о течении беременности не позволяет провести анализ причин возникновения гидроцефалии. Учитывая данные анамнеза, вероятным является воздействие генетических, инфекционных или токсических факторов.

Помимо пациента А.А. (SRY152) клинические проявления поражения головного мозга отмечено нами еще у 5 SRY-позитивных 46,XX пациентов (2 взрослых и 3 детей). Таким образом, поражение ЦНС выявлено у 6 из 61 (9,8%) больных, в том числе у 6 из 50 (12%) SRY-позитивных пациентов. Очевидно, что причиной формирования пола по мужскому типу у них также явилась транслокационная форма XX-инверсии пола.

У одного взрослого пациента (SRY100), страдавшего эпилепсией, не наблюдали снижения интеллекта. При МРТ головного мозга у него диагностирована киста левого полушария мозжечка объемом около 10см³.

У другого (пациент В.А., AZF617), имевшего гипогонадизм, гинекомастию, избыток веса, выявлена асимметрия размера боковых желудочков головного мозга с преобладанием размеров левого над правым. Среди мальчиков с кариотипом 46,XX у одного пациента 12 лет в анамнезе отмечено преждевременное половое развитие (ППР) центрального генеза, развившееся в возрасте 3 лет и вызванное глиомой супраселлярной области, а также нейрофиброматоз, унаследованный от больного отца (пациент Ш.И., SRY140); у двух других больных (Д.Т. и SRY253) - задержка физического и психомоторного развития.

У одного 46,XX мальчика (Д.Т., 1г.) диагностировано гипоксическое

поражение ЦНС, синдром мышечной дистонии. Молекулярный кариотип данного пациента по результатам микроматричного анализа (CGH-array, микроматрица Affymetrix Cytoscan HD 2.67 млн. проб):

arr10q26.13,q26.2,q26.3(126235695–135427143)×1

arrXp22.33(168546–2696692)×3

arrYp11.31(2650140–5491978)×1.

У пациента Д.Т. обнаружено наличие ауtosомной и гоносомной микроструктурной перестроек. Ауtosомная представлена микроделецией длинного плеча хромосомы 10 размером 9.191.448 п.н., захватывающей локусы 10q26.13, 10q26.2 и 10q26.3. Хотя в литературе не описано микроделеционных или микродупликационных синдромов, ассоциированных с данным дисбалансом по генетическому материалу, в базах данных ISCA и DECIPHER обнаруженная микроделеция оепределена как патогенная, связанная с задержкой развития и характерным фенотипом, в том числе с врожденными пороками развития.

Обнаруженная микродупликация короткого плеча X-хромосомы Xp22.33 размером 2.528.146 п.н. и наличие фрагмента короткого плеча Y-хромосомы с сохранением дистальной части MSY-региона обусловлена микроструктурной перестройкой гоносом, возникшей в результате Yp;Xp транслокации. В данном случае точка разрыва в перестроенной (дериватной) X-хромосоме располагалась в дистальной части региона PAR1 позиция 168.546 п.н., что привело к трипликации большей части PAR1, а точка разрыва в коротком плече Y-хромосомы в локусе Yp11.2 в области локализации гена *PCDH11Y* (рис. 52).

Схожий механизм возникновения Yp;Xp транслокации с расположением точки разрыва в PAR1 регионе X-хромосомы и трипликацией части его генов описан Ross et al. (2001) (рис. 48).

В группе больных с XX-инверсией пола у одного из пациентов выявлен семейный случай нарушения формирования пола, который будет описан ниже.

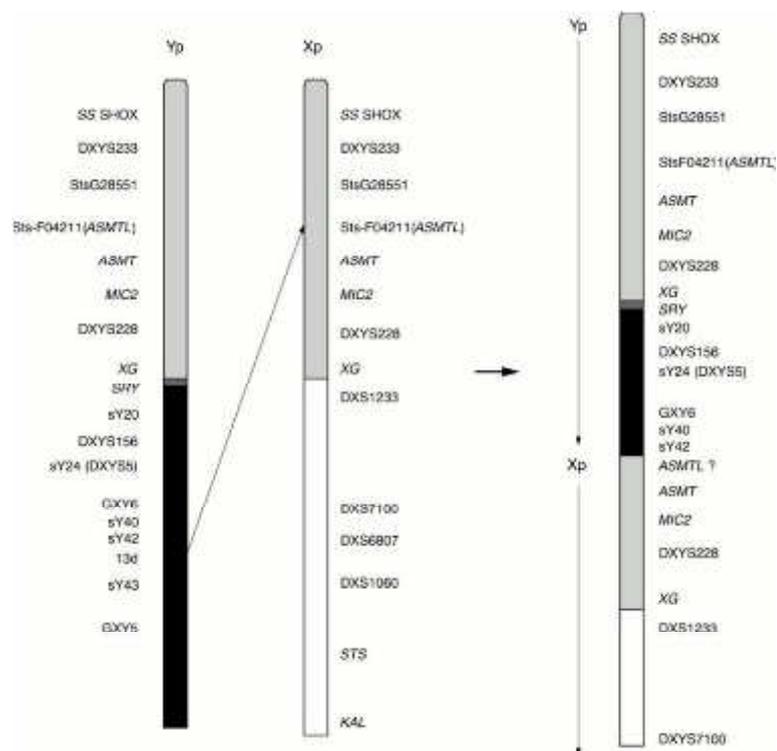


Рис. 48. Схематичное изображение механизма образования дериватной SRY-несущей X-хромосомы, возникающей вследствие транслокации Yp11 материала на дистальную часть короткого плеча X-хромосомы с точками разрыва в регионе PAR1, приводя к трипликации его генов.

Клинический случай 12.

Семья Э. (чеченцы). Фрагмент родословной приведен на рисунке 53.

Пробанд: Пациент Э.М., 12г. При рождении обнаружено неправильное строение гениталий. Паспортный пол и пол воспитания – мужской. На момент обследования: рост – 140 см (SDS роста -1,12), вес – 31 кг; физическое развитие соответствует 10 годам. Телосложение маскулинное. Наружные гениталии развиты по интерсексуальному типу. Мошонка расщеплена, шалевидная, умеренно складчатая, малопигментирована. Гонады в мошонке, справа 1,2 мл, слева – 1 мл объемом, плотноэластической консистенции. Кавернозные тела недоразвиты, искривлены (микропения): наружная часть - 27 мм, внутренняя – 25 мм. Мошоночная форма гипоспадии. По данным УЗИ: за мочевым пузырем определяется полостное образование округлой формы с тонкими стенками, жидкостным однородным содержимым (влагалищный отросток уrogenитального синуса); расщепление задней уретры до 4 мм. Оба яичка в мошоке, структура однородная, пониженной эхогенности; придатки яичек справа - 5×5 мм, слева 4×3

мм. Кавернозные тела расположены срединно в надлобковой области, длиной 25 мм, шириной 10 мм.

Кариотип по данным цитогенетического исследования: 46,XY (первично), повторно – 46,XX. Результаты ПЦР-анализа половых хромосом выявили отсутствие Y-специфичных последовательностей. Заключительный диагноз пациента Э.М.: (SRY-) 46,XX-инверсия пола, мошоночная форма гипоспадии.

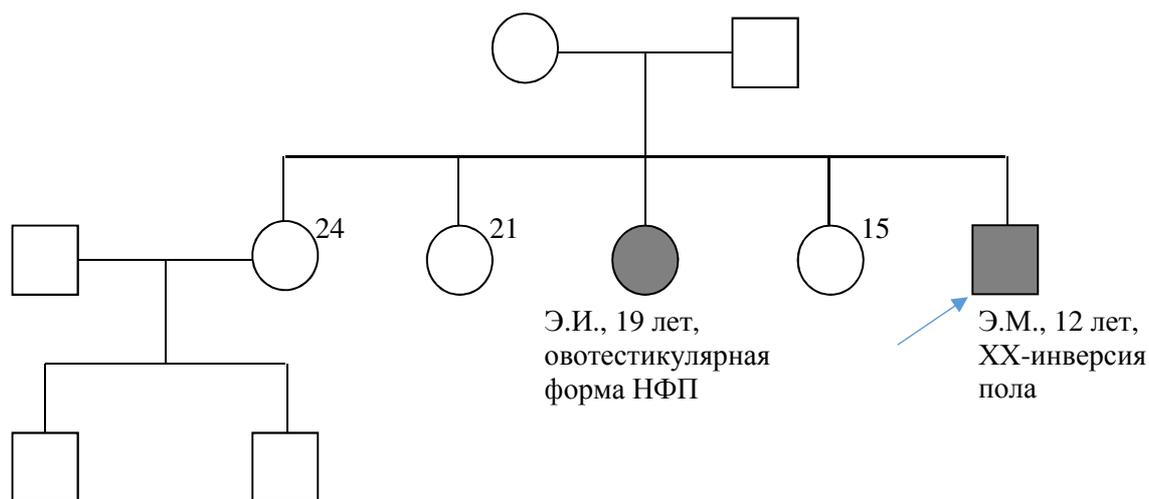


Рис. 53. Фрагмент родословной семьи Э. с двумя пораженными сибсами (Э.И., 19 лет и Э.М., 12 лет). Пробанд (Э.М.) указан стрелкой.

Пациентка Э.И., 24г. (родная сестра пробанда). При рождении обнаружено неправильное строение гениталий. Паспортный пол и пол воспитания – женский. Менструации с 14 лет. Физическое развитие и уровень гормонов соответственно возрасту и женскому полу. Рост – 164 см, вес – 64 кг. Из данных анамнеза в 2003г. (в возрасте 22 года) пациентке проведена гонадэктомия справа, (являлась содержимым паховой грыжи). Макроскопически гонада расценена как яичко, однако данные гистологического исследования не сохранены. При лапароскопии, проведенной в 2005 г. (в 24 года), в малом тазу обнаружена однорогая матка, слева - яичник с фолликулами, выполнена клиторэктомия и феминизирующая пластика наружных половых органов.

Кариотип по данным цитогенетического исследования: 46,XX. Молекулярно-генетическое исследование не проводили. Окончательный диагноз у пациентки Э.И.: Овотестикулярная форма нарушения формирования пола.

Представленный выше семейный случай является наглядным примером того, что XX-инверсия пола может сочетаться с овотестикулярной формой НФП. В

литературе сообщали случаи 46,XX тестикулярной формы НФП и истинного гермафродитизма у сибсов. В данном случае очевидно, что пациенты могли иметь общую мутацию в аутосомном или X-сцепленном гене, контролирующем дифференцировку гонад. Примечательно, что оба больных сибса имели одинаковый кариотип (46,XX), но различное развитие органов половой системы: по мужскому полу с дефицитом маскулинизации (Э.М.) или по женскому (Э.И.). Особо следует отметить наличие ошибки в определении кариотипа у одного из пациентов (Э.М.) при первичном цитогенетическом исследовании. К сожалению, сестра пробанда не была доступна для обследования, поэтому мы не могли подтвердить ее кариотип, провести анализ гоносом.

Таким образом, у пациентов с XX-инверсией пола частота выявленных структурных мутаций половых хромосом являлась наибольшей из всех обследованных групп. Наличие SRY гена обнаружено у 84% пациентов, что в 82% случаев было обусловлено транслокационной (Yp+) формой XX-инверсией пола, а в 2% - скрытым мозаицизмом по хромосоме Y. У 9 из 10 SRY-позитивных пациентов, обследованных с помощью FISH анализа, выявлена 'скрытая' транслокация фрагмента короткого плеча Y-хромосомы на короткое плечо хромосомы X (локус Xp22.3) и у одного – на короткое плечо хромосомы 22 (локус 22p12).

У 60 из 69 (87%) пациентов данной группы при стандартном цитогенетическом исследовании обнаружен нормальный женский кариотип (46,XX), у остальных - редкие цитогенетические варианты XX-инверсии пола: 45,X (2,9%), mos 45,X/46,XX (4,3%), 45,XX,der(13;14)(q10;q10)(1,4%), скрытый мозаицизм по хромосоме Y (1,4%).

Наличие явного или скрытого гоносомного мозаицизма установлено, по крайней мере, у 15,7% индивидуумов с XX-инверсией пола. Среди выявленных случаев преобладал мозаицизм по X-хромосоме, который обнаружен только среди (Yp+) пациентов. Мозаицизм по хромосоме X (45,X/46,XX, n=3) и мозаицизм по дериватной X- хромосоме, несущей фрагмент локуса Yp11, выявлен у SRY-позитивных пациентов с XX-инверсией пола (n=3). У одного XX-мужчины выявлен сложный мозаицизм с 3 клонами 45,X^{SRY+}/46,X^{SRY-}X^{SRY+}/47,X^{SRY-}X^{SRY+}X^{SRY+}, у другого XX-мужчины, имевшего кариотип 45,XX,der(13;14)(q10;q10), обнаружены два

клона: $X^{SRY-}X^{SRY+}$ и $X^{SRY+}X^{SRY+}$, с одной и двумя дериватными X-хромосомами, несущими фрагмент Yp. У пациента с кариотипом 45,X и мужским фенотипом выявлено наличие двух клонов (X^{SRY-}/X^{SRY+}): один с неперестроенной хромосомой X, другой с перестроенной хромосомой X, несущей фрагменты короткого плеча (Yp11) и гетерохроматинового региона Yq12.

У 28% пациентов с XX-инверсией пола наблюдали признаки неполной маскулинизации различной выраженности, чаще отмеченные у 3 из 8 SRY- мужчин по сравнению с 9 из 42 SRY+ мужчин данной группы. У всех спермиологически обследованных взрослых пациентов – первичное бесплодие, секреторную азооспермию или олигогозооспермию тяжелой степени/криптозооспермию.

3.10. Анализ мутаций гена SOX3 у пациентов с XX-инверсией пола и пациентов с овотестикулярной формой нарушения формирования пола.

Ген SOX3 (*sex determining region Y-box 3*) является X-гомологом гена SRY и располагается на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq27.1. Кодированный им белок является членом семейства SOX (*SRY-related HMG-box*) – транскрипционных факторов, вовлеченных в контроль дифференцировки различных типов клеток, а также в регуляцию формирования мозга в ходе эмбрионального развития [Stevanović et al., 1994]. Мутации или дубликации гена SOX3 являются причиной некоторых форм септо-оптической дисплазии, вызывают X-сцепленный гипопитуитаризм, а также являются причиной одной из форм X-сцепленной умственной отсталости. При этом 46,XY мужчины с мутациями гена SOX3 имеют мужской фенотип, низкий рост, признаки недостаточности гормонов гипофиза (пан-гипопитуитаризм), а также могут иметь умеренную или легкую степень умственной отсталости. Дубликации гена SOX3 являются одной из причин SRY-отрицательной XX-инверсии пола. Несколько случаев XX-инверсии пола и наличия микродупликаций в локусе Xq27, обнаруженных с помощью молекулярных методов, описаны в литературе [Woods et al., 2005; Sutton et al., 2011; Moalem et al., 2012].

Данные по пациентам, обследованным на наличие мутаций гена *SOX3*.

№	Код пациента	Возраст, лет	Диагноз	Маскулинизация	Кариотип	Ген <i>SOX3</i>	Маркеры Yp и Xp				Yq маркеры (AZFa,b,c)
							<i>SRY</i>	<i>ZFX</i>	<i>ZFY</i>	<i>AMELX</i>	
1	SRY124	27	Синдром 46,XX-мужчина, Б-I, азооспермия	полная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
2	SRY100	27	Синдром 46,XX-мужчина, Б-I, азооспермия	полная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
3	SRY77	1	XX-инверсия пола, гипоспадия, двухсторонний крипторхизм	неполная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
4	SRY33	26	Синдром 46,XX-мужчина, Б-I, азооспермия	полная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
5	SRY101	15	XX-инверсия пола, гипогонадизм	неполная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
6	SRY154	12	Синдром 46,XX-мужчина	полная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
7	SRY139	10	XX-инверсия пола	неполная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
8	SRY140	12	Синдром 46,XX-мужчина, нейрофиброматоз, глиома супраселлярной области, ППР центрального генеза	полная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
9	SRY109	4	XX-инверсия пола	неполная	46,XX	норма	+	+	+	-	-
11	SRY67	10	XX-инверсия пола, гипоспадия	неполная	46,XX	норма	-	+	+	-	-
12	SRY55	32	Синдром 46,XX-мужчина, Б-I, азооспермия	полная	46,XX	норма	-	+	+	-	-
13	SRY69	3	XX-инверсия пола	неполная	46,XX	норма	-	+	+	-	-
14	SRY41	Н.с.	XX-инверсия пола	неполная	46,XX	норма	-	+	+	-	-
15	Г.Х.	Н.с.	овотестикулярная форма НФП	неполная	46,XX	норма	-	+	+	-	-
16	О.А.	16	овотестикулярная форма НФП	неполная	46,XX	норма	-	+	+	-	-

Примечание: Н.с. – нет сведений. ППР – преждевременное половое развитие.

С целью исследования наличия/делеций и мутаций гена *SOX3* в регуляции дифференцировки гонад и фенотипических проявлениях при XX-инверсии пола нами проведен молекулярный анализ гена *SOX3* у 16 пациентов с XX-инверсией пола: 14 пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП (46,XX-мужчин) и 2 пациента с овотестикулярной формой НФП (истинным гермафродитизмом, ИГ согласно прежней терминологии) (табл. 32).

Возраст пациентов варьировал от 1 года до 32 лет. Все обследованные данной группы имели кариотип 46,XX (лимфоциты периферической крови). У обоих больных с овотестикулярной формой НФП (ИГ) наблюдали признаки двойственного развития внутренних половых органов и недостаточность маскулинизации наружных половых органов. У 7 из 14 пациентов с синдромом 46,XX-мужчина/XX-инверсией пола также отмечали какие-либо из перечисленных ниже признаки внутриутробного и/или постнатального дефицита андрогенов, признаков гипогонадизма: гипоспадию, крипторхизм и уменьшенный в размере половой член (микропению).

У одного SRY-позитивного пациента (SRY140) с преждевременным половым развитием (ППР), диагностирована супраселярная опухоль, а также нейрофиброматоз. Низкий рост и умственная отсталость не отмечены среди обследованных пациентов данной группы.

У обоих больных с овотестикулярной формой НФП, а также у 4 из обследованных пациентов с синдромом 46,XX-мужчина/XX-инверсией пола, не обнаружено наличия гена SRY или других Y-специфичных локусов в геномной ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови. У остальных 10 SRY-позитивных пациентов выявлено наличие локусов SRY и ZFY при отсутствии локуса AMELY(AMGL) и Yq-специфичных маркеров (из регионов AZFa, AZFb и AZFc), что указывало на наличие скрытой транслокации материала короткого плеча Y-хромосомы (табл. 32). Наличие обеих исследованных (в качестве внутреннего контроля) последовательностей короткого плеча X-хромосомы – *AMELX* (локус Xq22.2) и *ZFX* (локус Xq22.11) детектировано у всех пациентов. Ни у одного больного с XX-инверсией пола и овотестикулярной формой НФП не обнаружено делеций и мутаций в гене *SOX3*.

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают данные, полученные Lim и соавт., которые не обнаружили делеции и точковые мутации гена *SOX3* у пациентов с XX-инверсией пола/синдромом 46,XX-мужчина (Lim et al., 2000). В отличие от делеций и точковых мутаций гена *SOX3* микродупликации захватывающие данный ген и инсерции в локусах *Xq26-Xq27* могут привести к его гиперэкспрессии, что инициирует полную или частичную дифференцировку по мужскому типу и развитие яичек или овотестис даже при отсутствии Y-хромосомы и/или гена *SRY*. Эти нарушения обуславливают некоторые случаи *SRY*-негативной XX-инверсии пола. При этом степень дифференцировки по мужскому типу и развитию половой системы варьирует от синдрома 46,XX-мужчина (46,XX тестикулярной форме НФП) до двойственного развития гонад – овотестикулярной формы НФП [Sutton et al., 2011; Moalem et al., 20012; Haines et al., 2015].

3.11. Картирование точек разрыва в Y-хромосоме у пациентов с цитогенетически идентифицированными несбалансированными и микроструктурными перестройками половых хромосом.

С целью уточнения типа перестройки, а также выяснения механизма ее возникновения, нами проведено картирование точек разрыва при различных структурных перестройках гоносом с вовлечением Y-хромосомы или ее материала.

3.11.1. Картирование точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы.

Картирование точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы выполнено у 56 пациентов, имевших цитогенетически идентифицированные и микроструктурные перестройки с вовлечением Y-хромосомы. Из них: 40 (Yr+)XX-инверсией пола и 16 пациентов с различными формами нарушения формирования пола или бесплодием, имевшим в кариотипе различные несбалансированные перестройки с вовлечением Y-хромосомы и/или гоносомный мозаицизм (рис. 54 и 55, табл. 33).

Применяли мультиплексную ПЦР с 2 наборами праймеров, специфичных для 11 маркеров короткого плеча Y-хромосомы. Первый набор позволял исследовать 8 Yr-специфичных локусов (рис. 54), второй - еще 3 локуса в генах *PCDH11Y* и

TGIF2LY. У пациента (Д.Т.) расположение точек разрыва в гоносомах определено по результатам хромосомного микроматричного анализа (array CGH).

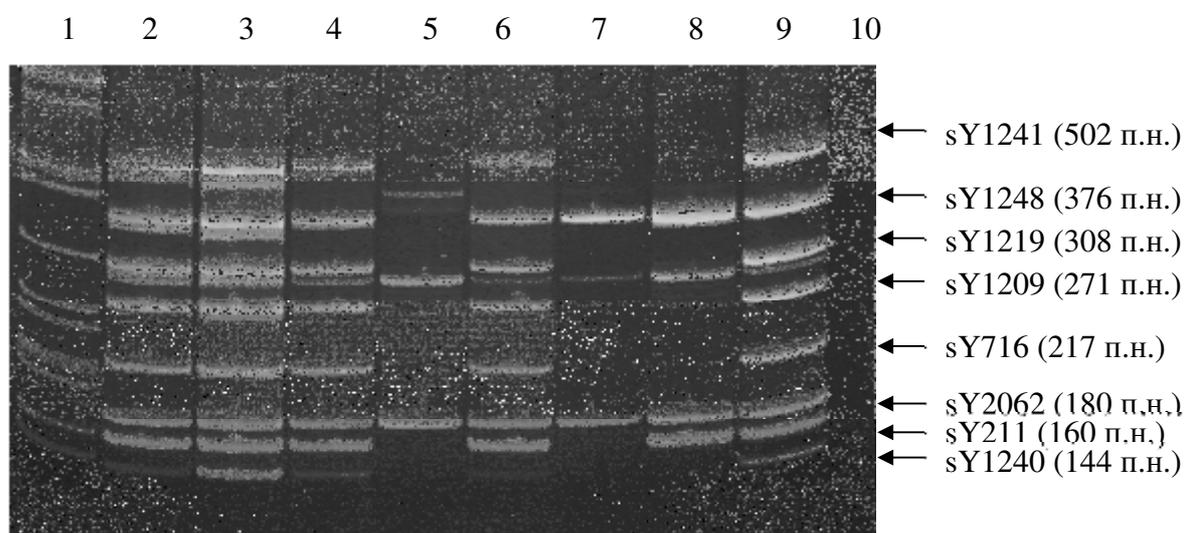


Рис. 54. Электрофореграмма результатов мультиплексной ПЦР с набором праймеров для 8 Y-специфичных STS-локусов. Дорожки: 1 – (Mr) – маркер молекулярного веса; 2-8 - образцы ДНК от пациентов с XX-инверсией пола; 9 – (К+) - положительный контроль (ДНК фертильного мужчины); 10 – (К-) – отрицательный контроль (смесь реагентов без ДНК).

Точки разрыва в MSY регионе короткого плеча Y-хромосомы картированы у 51 из 56 пациентов (табл. 33). Результаты картирования точек разрыва в Yp11 у 38 индивидуумов приведены рисунке 55.

В 5 случаях, когда точки разрыва не удалось картировать в MSY области, они располагались в PAR1 регионе (n=3) или центромерной области (Ycen)/проксимальной части эухроматина Yp11 (n=2). Так, пациента с кариотипом 46,X,idelic(Y)(p11.2) – точка разрыва располагалась в Yp11 между ее центромерой (делеционный интервал 4A) и локусом *AMELY*, у пациента K2154 с мозаицизмом 45,X/46,X,idelic(Y)(p10) – точка разрыва вероятно располагалась в центромерном гетерохроматине (Ycen) или проксимальной части эухроматина Yp11; у 3 SR^Y+ пациентов с регулярной или мозаичной изодисцентрической хромосомой idic(Yq), точки разрыва располагались дистальнее локуса *SRY*, вероятно в регионе псевдоаутосомного региона, PAR1 или на границе PAR1 и MSY (PAB Y). У пациентки с дисгенезией гонад и аменореей, у которой по данным цитогенетического обследования обнаружена изохромосома по длинному плечу Y – кариотип 46,X,i(Y)(q10), анализ маркеров короткого плеча Y-хромосомы

позволил установить, что точка разрыва располагается не в центромере Y-хромосомы, в проксимальной части ее короткого плеча – между локусами sY1209 и sY1219.

Таблица 33

Результаты картирования точек разрыва в коротком плече Y-хромосомы.

Группа пациентов/ кариотип	n	Локусы		Делеционные интервалы/локус, в которых локализована точка разрыва в Yp11		
		SRY	AMELY	1A-1E (Yp11.31)	2A-2C (Yp11.2)	3A-3G (Yp11.2)
XX-инверсия пола	39	+	-	6	7	26
	1	+	+	-	-	1
46,X,del(X)(q22)	1	+	-	-	1	-
46,XY-дисгенезия гонад полная форма	5	-	+	5	-	-
mos 46,XX/46,XY	1	-	+	1	-	-
mos 45,X/46,XY	2	-	+	2	-	-
47,XXY-женщина с дисгенезией гонад	1	-	+	1	-	-
46,X,idic(Y)(p11.2) ¹	1	-	-	-	-	-
mos 45,X/ 46,X,idic(Y)(p10) ¹	1	-	-	-	-	-
46,X,i(Y)(q10)	1	-	-	-	-	1
mos 45,X/ 46,X,idic(Y)(p11.3) ²	1	+	+	-	-	-
46,X,idic(Y)(p11.3) ²	2	+	+	-	-	-
Всего:	56			15	8	28

Примечание: n - количество обследованных пациентов. ¹ - точка разрыва вероятно располагается в центромерном гетерохроматине (Ycen) или проксимальной части эухроматина Yp11. ² - точка разрыва располагается дистальнее локуса SRY, вероятно в псевдоаутосомном регионе PAR1 или на границе дистальной части короткого плеча MSY и PAR1 региона (PAB Y).

Таким образом, данная перестройка является изодисетрической хромосомой Y по ее длинному плечу – кариотип 46,X,idic(Y)(p11.2). В данном случае у пациентки, по-видимому, сохранен локус гонадобластомы (GBY), содержащий блок мультикопийных генов TSPY.

Рис. 55. (описание). Справа широкой полосой серого цвета показан псевдоаутосомный регион 1 (PAR1), слева – широкой полосой серого цвета с диагональной исчерченностью гетерохроматин центромерной области (Ycen) Y-хромосомы. Желтым сектором обозначена X-дегенеративная область, зеленым сектором – Xq21.3/Yp11.2 гомологичная область (регион XTR, X chromosome translocated region), светло-сиреневым – область ампликонов короткого плеча Y-хромосомы. Вертикальной полосой с диагональной исчерченностью, проходящей через ген *PRKY* – область горячих точек Xp-Yp рекомбинации/разрывов Yp11.2. Сверху приведена карта MSY региона короткого плеча Y-хромосомы с указанием расположения его генов и анализированных STS-маркеров, а также положение внутривхромосомных повторов (IR) и область парацентрической инверсии, фланкированной повторами IR3. Горизонтальными толстыми полосами черного цвета показан присутствующий фрагмент, серой полосой – участки, наличия или отсутствия которых точно не определено, пунктирной линией – отсутствующий фрагмент Y-хромосомы. Слева от них указаны типы нарушений формирования пола, классы (Yp+)XX-инверсии пола, синдрома 46,XX-мужина, слева – кариотипы обследованных пациентов.

Учитывая этот факт, пациентке было проведено удаление дисгенетичных гонад, несмотря на отсутствие большей части материала короткого плеча Y-хромосомы, в том числе гена *SRY*. Следует отметить, что вопрос об удалении гонад у *SRY*-негативных пациенток с нарушением развития яичников, имеющих фрагменты/последовательности Y-хромосомы остается нерешенным.

Среди 40 пациентов с (Yp+)XX-инверсией пола точки разрыва в коротком плече Y-хромосомы располагались в ее делеционных интервалах: первом (n=6), во втором (n=7) и в третьем (n=27), что определяет наличие у них (Yp+)XX-инверсии пола (XX-мужчина) класса I, II и III, соответственно, согласно классификации, предложенной ранее [Vergnaud et al., 1986]. За исключением одного мужчины (AZF998) с кариотипом 45,XX,der(13;14)(q10;q10) у всех пациентов с (Yp+)XX-инверсией пола III класса, отмечали наличие парацентрической инверсии в проксимальной части короткого плеча Y-хромосомы (локус Yp11.2). Данная инверсия размером 3,5 м.п.н., образуется в результате рекомбинации между фланкирующими ее повторами IR3 и является микроструктурным полиморфизмом Y-хромосомы, предрасполагающим к возникновению Xp-Yp транслокаций, встречающимся у 30% мужчин из европейских популяций [Tilford et al., 2001; Skaletsky et al., 2003].

В 26 из 27 (96,3%) пациентов с (Yr+) XX-инверсией пола III класса точка разрыва в локусе Yp11.2, очевидно возникла в Y-хромосоме, имеющей данную инверсию, а обнаруженные скрытые микроструктурные перестройки – транслокации материала Yp11, обусловлены аномальной X-Y рекомбинацией между парой гомологичных генов *PRKX* и *PRKY*. Данный механизм является наиболее частым при X-Y транслокациях, вызывающих Yr+ XX-инверсию пола и SRY- XY-дисгенезию гонад [Schiebel et al., 1997; Jobling et al., 1998].

У 11 пациентов с Yr+ XX-инверсией пола: во всех 7 случаях II класса, 4 из 6 случаев I класса, а также 2 пациенток женского пола с нарушением дифференцировки гонад (46,X,del(X)(q22) и 47,XXY) точки разрыва в коротком плече Y-хромосомы располагались в области локуса Yp11.2 (XTR регион, размер 3,5 м.п.н.), имеющим высокую гомологию с соответствующим регионом, располагающемся в длинном плече хромосомы X, в локусе Xq21.3. Вследствие высокой гомологии (98.78%) картирование точек разрыва в данных участка затруднено, однако нам удалось выявить вторую “горячую точку” разрыва в Yp11.2 – она располагалась внутри гена *PCDH11Y*. Данный ген имеет гомолог *PCDH11X*, располагающийся в регионе Xq21.3. Y-копия возникла в результате дупликации и транслокации фрагмента длинного плеча X-хромосомы, содержащие X-гомологичные гены (*PCDH11X*, *TGIF2LX*) на короткое плечо хромосомы Y в ходе эволюции млекопитающих 5-6 млн. лет назад. В этой области одна из самых высоких частот рекомбинации и SNP-полиморфизмов среди всех участков X-хромосомы и недавно было показано, у по крайней мере у 2% в популяции имеет место рекомбинация между данными гомологичными регионами половых хромосом, которые предложено называть псевдоаутосомный регион 3, PAR3 [Veerappa et al., 2013].

Аномальная X-Y рекомбинация имело место у пациентки П.А. (SRY269), первичным кариотип которой был первично определен как: 46,X,del(X)(q22). Молекулярно-цитогенетическое исследование позволило выявить, что перестройка представляет собой не просто терминальную делецию Xq22, а дериватную хромосому с потерей части длинного плеча (Xq22-q27) и транслокацией фрагмента короткого плеча Y-хромосомы (Yp11) на длинное плечо перестроенной X-хромосомы – der(X)t(X;Y)(q21.3p11.3)(DXZ1+,SRY+). Выявленная перестройка

является уникальной, поскольку подобные перестройки не были описаны ранее в литературе. Единственный случай скрытой Yp/Xq транслокации с геном *SRY*, выявленный у 46,XX пациента с истинным гермафродитизмом сообщен Margarit et al. [2000]. В том случае выявлена микроструктурная перестройка – терминальная транслокация фрагмента Yp11, содержащего ген *SRY*, на длинное плечо хромосомы X в локус Xq28. Кроме того, ранее описан случай уникальной дицентрической X-Y хромосомы, возникшей в результате Xq-Yp рекомбинации у 32-летней пациентки с вторичной аменореей и бесплодием [Bernstein et al., 1987]. В последнем случае точки разрыва также как у обследованной нами пациентки П.А. (SRY269), располагались в областях локализации XTR региона (Xq21.3/Yp11.2). Однако в случае дицентрической хромосомы был транслоцирован не терминальный фрагмент Yp11, а наоборот - большая часть Y-хромосомы без части дистальной части Yp11 с геном *SRY*. Потеря последнего объясняла отсутствие признаков вирилизации у пациентки с вторичной аменореей, а сохранение большей части генов X-хромосомы, в том числе генов короткого плеча (*SHOX* и др.) – отсутствие признаков, характерных для синдрома Шерешевского-Тернера. Важно также отметить, что в образованной дицентрической хромосоме супрессии подверглась центромера X-хромосомы, а центромера Y-хромосомы осталась активной.

В 5 случаях (у 4 *SRY*-положительных 46,XX-мужчин и *SRY*-негативной пациентки с кариотипом 47,XXY) точка разрыва в коротком плече располагалась в локусе Yp11.2 в области локализации другого X-Y гомологичного гена региона XTR – *TGIF2LY*. Таким образом, в 13 из 16 пациентов, имеющих точки разрыва в MSY регионе делеционного интервала 1 и 2, они располагались в X-Y гомологичной (XTR) области.

Среди 12 обследованных *SRY*-негативных индивидуумов 4 пациента имели полную форму дисгенезии гонад при кариотипе 46,XY (GR110, GR190, SRY162 и SRY268), 1 пациент – женский фенотип при кариотипе 47,XXY (SRY202), 1 пациент – mos 46,XX/46,XY (SRY185), 2 пациента – mos 45,X/46,XY (SRY160 и SRY186), 2 пациента с изодицентрической Y-хромосомой по длинному плечу (46,X,idic(Y)(p11.2) - SRY252 и mos 45,X/46,X,idic(Y)(p10) (K2154) Y-хромосомой и 1 пациент с изо-Yq хромосомой (AZF2052) (табл. 33).

В одном *SRY*-негативном случае 46,XY дисгенезии гонад обнаружена делеция Yp11, приведшая к частичной утрате локуса *SRY* с захватом его 3' – концевой области, что установлено с помощью ПЦР с использованием дополнительной пары праймеров для локуса *SRY*.

Таким образом, картирование точек разрыва при цитогенетические идентифицированных и микроструктурных перестройках гоносом с вовлечением Y-хромосомы или ее материала позволило установить, что для первых из них характерна локализация в регионе *PAR1* (изодицентрические *idic(Y)(p11.3)* хромосомы), точка разрыва при этом располагалась дистальнее локуса *SRY*, либо в проксимальной части короткого плеча (проксимальнее локуса *AMELY*) или в центромерном гетерохроматине - (изодицентрические хромосомы *idic(Y)(p11.2)* и *i(Y)(p10)* изохромосомы). В первом случае, вероятно, механизм образования перестроек обусловлен ошибками в ходе нормальной (эутопической) рекомбинации в *PAR1* регионе в ходе мейоза в сперматогенезе отца, а во втором не связан с рекомбинацией в *PAR1* регионе.

Исследованные микроструктурные несбалансированные перестройки с потерей или сохранением фрагмента Yp11 обусловлены транслокациями гена *SRY*, приведшими у их носителей к нарушению формирования пола. Установлено, что при данных перестройках точки разрыва располагаются в коротком плече региона *MSY*, в норме не участвующего в кроссинговере и процессе X-Y рекомбинации. В 28 из 51 (54,9%) случаев они располагались в делеционном интервале 3 (Yp11.2), в остальных 45,1% случаев - в делеционных интервалах 1 и 2 хромосомы Y. Расположение точек разрыва при этом неравномерно и они имеют преимущественную локализацию в области гена *PRKY* – 64,9% (Yp+) 46,XX-мужчин, а также в Xq21.3/Yp11.2 гомологичной (*XTR*) области, содержащей гены *PCH11Y*, *TGIF2LY*, - у 13 из 16 пациентов, имеющих точки разрыва в *MSY* регионе в делеционных интервалах 1 и 2. Наличие парацентрической инверсии в Yp11.2, является необходимым условием для возникновения практически всех случаев (Yp+)XX-инверсии пола класс II, и только в одном случае выявлен ее 'неклассический' генетический вариант, не связанный с парацентрической инверсией Yp и *PRKX-PRKY* рекомбинацией.

Выявлено наличие второй «горячей точки» X-Y рекомбинации, располагающейся в гене *PCDH11Y*. Учитывая наличие высокую гомологию с соответствующим ему X-гомологом *PCDH11X*, располагающийся в регионе Xq21.3, обнаружение скрытой Yp;Xq транслокации у пациентки с кариотипом 46,X,del(X)(q22) с точками разрыва в XTR регионе, Xq-Yp рекомбинация может является причиной структурных перестроек половых хромосом (транслокации, терминальные делеции) с точками разрыва в области XTR (псевдоаутосомного региона 'PAR3').

У пациенток женского пола с нарушением дифференцировки гонад, у которых в кариотипе обнаружена Y-хромосома без структурных перестроек (46,XY или 47,XXY), но имеющих делецию гена *SRY*, точки разрыва также располагались в дистальной части *MSY* региона короткого плеча Y, преимущественно вблизи или в самом локусе *SRY*, приводя в последнем случае к его частичной делеции.

3.11.2. Картирование точек разрыва в длинном плече Y-хромосомы.

Картирование точек разрыва в коротком плече выполнено для 44 пациентов, имеющих различные несбалансированные структурные аномалиями Y-хромосомы (выявленные с помощью цитогенетических методов изодисцентрические хромосомы по короткому плечу – *idicYp*, терминальные делеции Yq, кольцевые хромосомы *r(Y)*, маркерные хромосомы с неуточненным типом перестройки – дериваты Y), а также интерстициальные делеции длинного плеча Y-хромосомы – Yq11.2 микроделеции.

У всех 18 мужчин, у которых нами обнаружено наличие делеций только AZFa региона, делеция целиком удаляла оба гена (*DBY* и *USP9Y*) данного участка Y-хромосомы. Это характерно для полных делеций AZFa региона, фланкированного копиями эндогенного вируса герпеса 15, рекомбинация между которыми и является основным механизмом микроделетий и микродупликаций данного участка Yq. Некоторые авторы сообщали о делециях AZFa, частичных захватывающих один или оба гена.

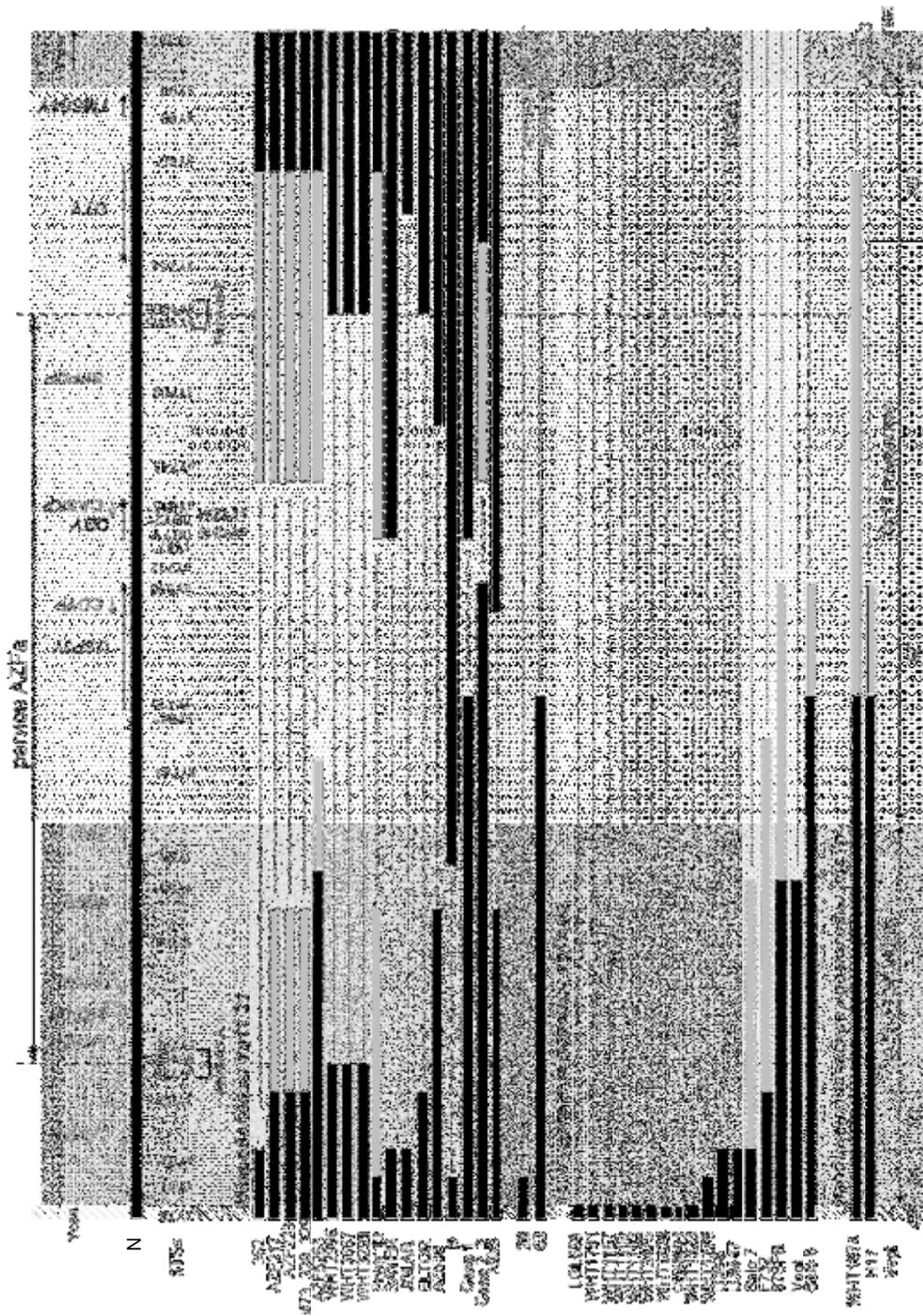


Рис. 56. Расположение точек разрыва в регионе AZFa (Yq11.21) при микроделециях и цитогенетических перестройках (терминальных делециях, изодисцентрических хромосомах *idic*(Yp) длинного плеча Y-хромосомы (собственные результаты и данные других исследователей).

Рис. 56. Примечание: Сверху указаны положение и размер AZFa региона. Его границы фланкируют 2 копии эндогенного вируса герпеса HERV15(Provirus A и Provirus B). Ниже в виде черной полосы с встроенными серыми стрелками (палиндромами P1-P8) – участок MSY региона длинного плеча Y-хромосомы (локус Yq11.21-23) с указанием расположения генов (указаны черным шрифтом), псевдогенов (указаны серым шрифтом) и STS-маркеров (указаны снизу, исследованные в работе маркеры помечены звездочкой «*»). Центромерная область, cen (часть) и направлены к терминальной области длинного плеча (qter) показаны слева и справа, соответственно. Ниже сплошной черной полосой показана протяженность нормальной (референсной) хромосомы Y (N). Далее вниз по группам (кариотипам) приведены результаты картирования микроделечий Yq11.2 и цитогенетических перестроек длинного плеча (терминальных Yq делеций и изодицентриков idicYp) Y-хромосомы с делециями части Yq эухроматина и/или гетерохроматина Yq11.2. Присутствующие участки показаны черной полосой, утраченные – пунктирной линией, участки, расположение точки разрыва в которых точно не определено – серыми полосами, белыми блоками – вероятно утраченные участки с повторяющимися локусами, наличие или отсутствие которых не может быть прямо определено из-за наличия дикопийности. Слева указаны коды обследованных пациентов. Снизу указаны делеционные интервалы Y-хромосомы (4B-5E). Области X-Y-гомологии показаны в виде серого блока в белый крап (гомология с локусом Xp22.3) и белого в серый крап (гомология с локусом Xp11.2).

Результаты картирования точек разрыва в Yp11.21 у обследованных нами мужчин с бесплодием, имеющих AZFa делеции или другие перестройки с точками разрыва в данном или в пограничных к нему областях, а также случаев, сообщенных другими исследователями собраны и отображены на рисунке 56.

Сравнительный анализ различных структурных перестроек с потерей фрагмента Yq с точками разрыва в локусе Yq11.21 по собственным результатам и данным других исследователей позволил установить определенное различие AZFa микроделечий от AZFa+b микроделечий, терминальных делеций. Еще более явным различие в локализации проксимальных точек разрыва у пациентов с AZFa микроделечиями и точек разрыва в локусе Yq11.21 у пациентов с изодицентрическими хромосомами idicYp. При этом для терминальных Yq11 делеций характерны точки разрыва ближе по направлению к центромере от проксимальной границы AZFa, а для изодицентриков – локализация разрывов внутри региона AZFa, делеционные интервалы 5C-5D по Vollrath et al. [1992] (рис. 56). Проксимальная часть AZFa региона имеет гомологию с локусом Xp22.3, а дистальная с локусом Xp11, при этом в них располагается, по

крайней мере, 9 псевдогенов (*ARSFP, ARSEP, ARSDP, XGPY, APXLP, CDYPP, CASKP, SFPQR*). Поскольку некоторые точки разрыва располагаются в области данных псевдогенов, можно предполагать их роль в X-Y рекомбинации и возникновении Yq11 делеций.

Картирование точек разрыва в локусах Yq11.221-Yq11.23 выполнено нами у 238 пациентов. Среди них у 22 пациентов с помощью цитогенетического исследования обнаружены структурные перестройки длинного плеча Y-хромосомы, у 212 обнаружены мозаицизм X/X^Y (или его варианты) и/или микроделеции регионов AZFb и/или AZFc. Четверо остальных пациентов имели СШТ. По данным стандартного цитогенетического исследования их кариотипом был первично определен как немозаичный – 45,X. Однако, по данным молекулярно-генетического исследования у них выявлен скрытый гоносомный мозаицизм с наличием клон(ов), несущих Y-хромосому с наличием делеции AZFb+c. Результаты картирования точек разрыва у 38 пациентов отображены на рисунке 57.

Согласно данным исследования микроделений Y-хромосомы у 200 пациентов (из описанных выше группы мужчин с бесплодием и других отобранных клинических групп), у которых обнаружены полные AZFc делеции, в 8 из 200 (96%) делеций помимо стандартных маркеров, утрачиваемых при делециях 'b2/b4' (см. табл. 8 Приложения 13) отсутствовали маркеры дистальной и/или проксимальной границы региона (результаты картирования не приведены).

Таким образом, результаты картирования точек разрыва при различных структурных перестройках с вовлечением Y-хромосомы свидетельствовали о их гетерогенной локализации. Так, для микроделений региона AZFa характерны полные делеции с утратой обоих генов данного региона (DBY, USP9Y). Для других типов микроделений Y-хромосомы, а также терминальных Yq делеций и изодицентрических хромосом idicYp с захватом данного региона точки характерно более проксимальное расположение точек разрыва (в делеционном интервале 5A) или более дистальное (в делеционном интервале 5C в Xp11 гомологичной области). Расположения точек разрыва в палиндромах характерно для полных микроделений регионов AZFb и/или AZFc (AZFb+c, AZFb, AZFc), а также изодицентрических хромосом Y по короткому плечу (idicYp).

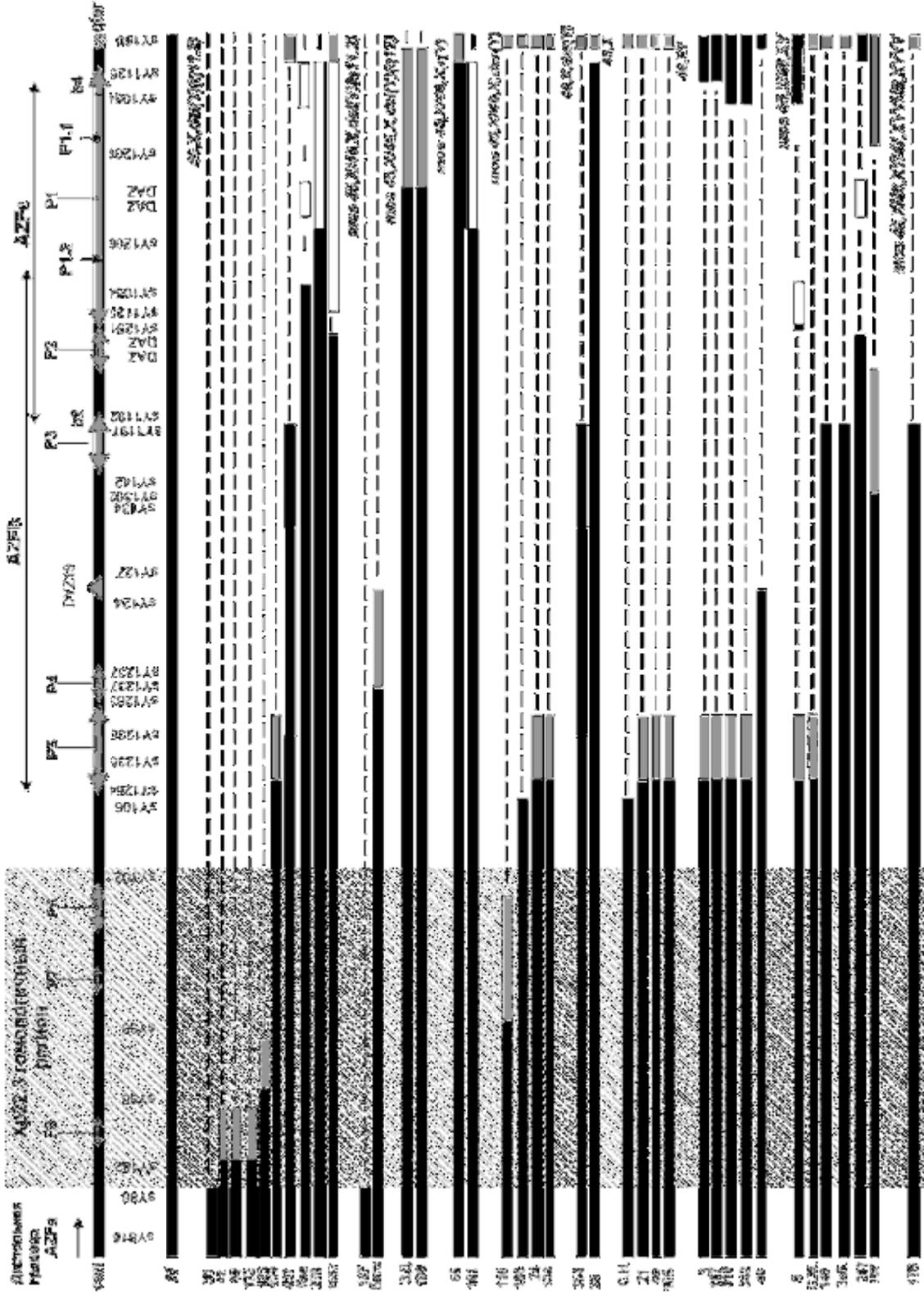


Рис. 57. Расположение точек разрыва в регионах AZFb и AZFc (Yq11.22-23) при микроделециях и цитогенетических перестройках Y-хромосомы (терминальных делециях, изодисцентрических хромосомах idicYr, кольцевых и дериватных хромосомах Y).

Рис. 57. Примечание: Сверху указаны положение и размер регионов AZF (для региона AZF только его часть – дистальная раница). Ниже в виде черной полосы с встроенными серыми стрелками (палиндромами P1-P8) – участок MSY региона длинного плеча Y-хромосомы (локус Yq11.21-23) с указанием расположения исследованных STS-маркеров. Направление к центромерной области (cen) и к терминальной области длинного плеча (qter) указано слева и справа, соответственно. Ниже сплошной черной полосой показана протяженность нормальной (референсной) хромосомы Y (N). Далее вниз по группам (кариотипам) приведены результаты картирования структурных и микроструктурных перестроек длинного плеча Y-хромосомы с делециями части Yq эухроматина и/или гетерохроматина. Присутствующие участки показаны черной полосой, утраченные – пунктирной линией, участки, расположение точки разрыва в которых точно не определено – серыми полосами, белыми блоками – вероятно утраченные участки с повторяющимися локусами, наличие или отсутствие которых не может быть прямо определено из-за наличия дикопийности. Слева указаны коды обследованных пациентов, справа их кариотипы по результатам цитогенетического обследования. Между регионами AZFa и AZFb показано (в виде блока и с диагональной исчерченностью) расположение Xq22.3 гомологичного участка.

Полная делеция региона AZFc в 96% случаев была представлена классическим типов - b2/b4 делецией, в остальных точки разрыва располагались проксимальнее в области палиндрома P3.

Для терминальных делеций Yq11.2 характерны AZFb+c или AZFc делеции. В 50% делеций AZF вследствие несбалансированных цитогенетических перестроек длинного плеча Y с потерей регионов AZFb и AZFc точки разрыва располагались вне палиндромов (P1-8), в Xp22 гомологичной области. При терминальных Yq делециях с зазватом только региона AZFc выявлено различное расположение точек разрыва (как в области границ, так и внутри данного региона. Для “истинных” терминальных делеций дистального гетерохроматина (Yq12) точка разрыва, очевидно располагалась на границе эухроматина Yq11.23/гетерохроматина Yq12. При исследованных нами кольцевых хромосом не обнаружено делеций AZF регионов.

3.12. Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с синдромом Клайнфельтера.

Анализ результатов цитогенетического обследования у 222 пациентов, у которых выявлены аномалии кариотипа, характерные для синдрома Клайнфельтера (СК) ли его вариантов. Возраст пациентов вабировал от 6 до 43 лет. По результатам цитогенетического исследования выявлены 12 вариантов кариотипов (табл. 34). Все обнаруженные нами варианты СК можно условно подразделить на 6 групп.:

1. Регулярный («классический») вариант СК – 47,XXY.
2. С мозаицизмом XY/XXY или его вариантов.
3. С мозаицизмом XX/XXY или его вариантов.
4. С наличием маркерной, перестроенной (X или Y дериват) хромосомы в регулярной или мозаичной форме.
5. С полисомией по гоносомам (XXXY, XXYY и др.).
6. В сочетании с мутациями аутосом.

Таблица 34

Кариотипы пациентов с синдромом Клайнфельтера и частота различных цитогенетических вариантов СК (n=222).

Кариотип	n	% от всех вариантов	
47,XXY	194	87,38%	87,83%
47,XXY,t(3;8)(q23;p21)	1	0,45%	
mos 47,XXY/46,XY	13	5,86%	6,31%
mos 46,XY/47,XXY/48,XXYY	1	0,45%	
mos 47,XXY/46,XX	3	1,35%	1,80%
mos 46,XX/47,XX,del(Y)(q11.2)	1	0,45%	
47,X,der(X)Y	1	0,45%	1,35%
mos 47,XXY/48,XXY,+der(X)/46,XY	1	0,45%	
mos 47,XXY/48,XXY,+mar	1	0,45%	
mos 47,XY,+21/48,XXY,+21	1	0,45%	0,45%
48,XXXY	4	1,80%	2,25%
48,XXYY	1	0,45%	
Всего: 222	222	100%	

Наиболее частым вариантом являлся ‘классический’ цитогенетический вариант СК – кариотип 47,XXY (регулярная форма), который был нами обнаружен у 87,38% больных (табл. 34, рис. 58). У 9,5% пациентов с СК отмечали наличие гоносомного мозаицизма с наличием эуплоидного клона (46,XX или 46,XY) и клон(ов) с анеуплоидией по гоносомам: 47,XXY; 48,XXYY; 48,XXY,+der(X), и в одном случае – по гоносомам и аутосомам 47,XY,+21/48,XXY,+21. В 5 (2,25%) случаях СК обнаружена немозаичная тетрасомия по гоносомам: 48,XXXУ или 48,XXYY. Структура различных цитогенетических вариантов СК приведена в рисунке 58.

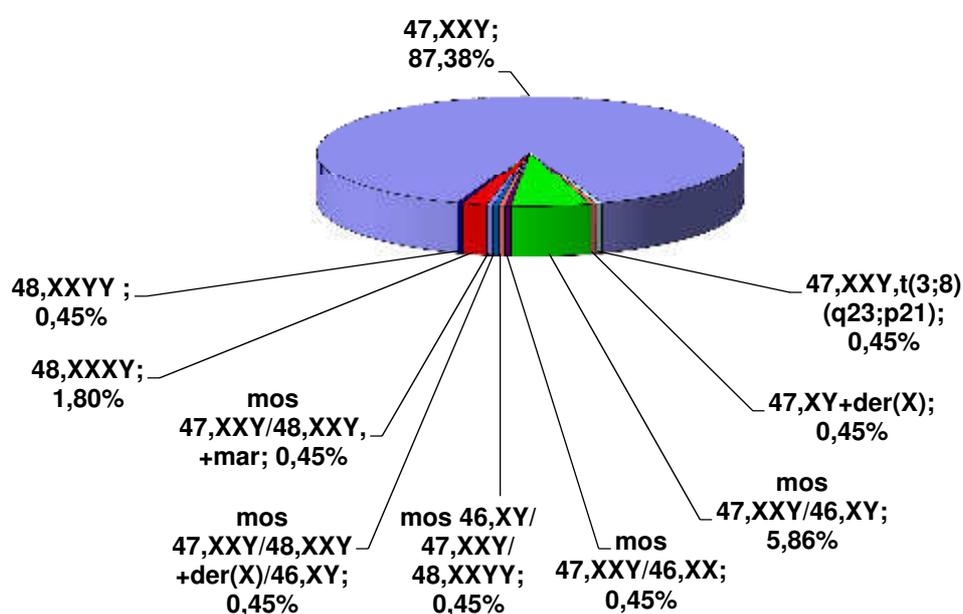


Рис. 58. Частота различных кариотипов, выявленных у 222 больных с синдромом Клайнфельтера и его вариантами.

Некоторым пациентам с синдромом Клайнфельтера с целью обнаружения скрытого мозаицизма или оценки/верификации гоносомного мозаицизма выявленного с помощью стандартного цитогенетического исследования проведен FISH анализ с ДНК-зондами к центромерным регионам хромосом X и Y (табл. 35).

В литературе сообщали о случаях структурных перестроек хромосом X и Y [Heinritz et al., 2005; Stemkens et al., 2007], а также о микроделециях Y-хромосомы у пациентов с СК [Semli et al., 2006]. Некоторые авторы свидетельствуют о повышенной частоте встречаемости AZF микроделеций у пациентов с синдромом

Клайнфельтера [Mitra et al., 2006; Hadjkacem-Loukilet al., 2009; Ceylan et al., 2010], однако другие исследователи не подтвердили этого [Choe et al., 2007].

Таблица 35

Результаты FISH анализа у 10 пациентов с синдромом Клайнфельтера.

№	Код пациента	Кариотип по результатам стандартного цитогенетического исследования	Результаты молекулярно-цитогенетического исследования - FISH анализа (на лимфоцитах периферической крови)
1	24333	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[300]
2	An55	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[300]
3	К.М.	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[300]
4	М.М.	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[300]
5	С.А.	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[200]
6	AZF1187	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[489]/ (DXZ1×3,DYZ3×1)[4]/ (DXZ1×1,DYZ3×1)[7]
7	AZF6093	47,XXY	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[293]/ (DXZ1×1,DYZ3×1)[7]
8	М.А.	mos 47,XXY[40]/46,XY[8]/ 46,XX[2]	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[380]/ (DXZ1×3,DYZ3×1)[18]/ (DXZ1×2,DYZ3×0)[2]
9	F436	mos 47,XXY[7]/46,XY[23] (первично, лимфоциты), mos 47,XXY[13]/46,XY[17] (повторно, лимфоциты)	nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×1)[100] (буккальный эпителий)
10	О.И.	46,XY(85%)/47,XXY(15%)	nuc ish(DXZ1×1,DYZ3×1)[100]

С целью исследования встречаемости микроделций эухроматиновой области длинного плеча Y-хромосомы нами выполнен поиск ‘классических’ (‘полных’) и частичных делений различных регионов локуса AZF. Для проведения молекулярно-генетического исследования были доступны образцы крови от 100 больных с СК или мозаицизмом с наличием в кариотипе клона 47,XXY. Кариотипы обследованных пациентов: 47,XXY (n=86), mos 46,XY/47,XXY (n=7), mos 46,XX/47,XXY (n=1), 47,Xder(X)Y (n=1), 48,XXXXY (n=1), 48,XXYY (n=1), mos 47,XXY/48,XXXXY/46,XY (n=1), 47,XXY,t(3;8)(q23;p21) (n=1), mos 46,XX/47,XX,del(Y)(q11.2) (n=1) (Табл. 36).

Результаты молекулярно-генетического анализа Y-хромосомы, проведенного в данной группе пациентов, свидетельствовали о наличии у всех

последовательностей короткого плеча – локусов *SRY* и *ZFX/ZFY*. Делеции в эухроматиновой области MSY-региона длинного плеча Y-хромосомы обнаружены у 16 из 100 (16%) пациентов с синдромом Клайнфельтера (табл. 36).

Таблица 36

Результаты молекулярно-генетического исследования на наличие микроделеций Y-хромосомы у 100 пациентов с синдромом Клайнфельтера.

Кариотип	Количество больных	Делеции AZF	
		полные	частичные AZFc
47,XXY	86	-	12 (b2/b3, n=9; gr/gr, n=3)
mos 46,XY/47,XXY	7	-	2 (b2/b3, n=1; sY1197, sY1206, n=1)
mos 47,XXY/48,XXXY/46,XY*	1	-	-
mos 46,XX/47,XXY	1	-	-
mos 46,XX/47,XX,del(Y)(q11.2)	1	-	-
47,XXY,t(3;8)(q23;p21)	1	-	-
47,Xder(X)Y	1	-	-
48,XXXY	1	-	-
48,XXYY	1	-	1 (b2/b3)
Всего:	100	-	15

Примечание: * – мозаицизм выявлен по результатам FISH анализа, первичный кариотип (по данным стандартного цитогенетического обследования) определен как немозаичный, 47,XXY.

Наличие полных делеций не выявлено ни у одного пациента с СК, в том числе имевшего кариотип mos 46,XX/47,XX,del(Y)(q11.2). Очевидно, что точка разрыва располагалась или дистальнее региона AZFc, на границе эухроматина Yq11.23 и Yq12 гетерохроматина или в локусе Yq12. Другим менее вероятным объяснением может быть скрытый гоносомный мозаицизм по Y с наличием клонов с делецией и без делеции в AZF локусе. Наличие частичных делеций, полностью захватывающих регион AZFc (локус Yq11.23) установлено у 15 обследованных пациентов с СК, из них: у 6 из 46 (13%) индивидуумов с СК или его вариантами. Среди обнаруженных микроделеций Y-хромосомы выявлены: делеция b2/b3 (n=11), делеция gr/gr (n=3) и редкая частичная делеция AZFc (n=1), характеризующаяся отсутствием маркеров sY1197 и sY1206 данного региона. Частичные делеции регионов AZFa и AZFb не обнаружены ни у одного из обследованных нами пациентов с синдромом Клайнфельтера.

Хотя выборка обследованных нами пациентов с СК и число обнаруженных у них микроделеций Y-хромосомы относительно невелики, распределение мест по частоте встречаемости частичных AZFc делеций соответствовало таковому у мужчин с бесплодием. Наиболее частым типом среди обнаруженных микроперестроек Y-хромосомы у них являлась делеция b2/b3, о наличии которой свидетельствовало отсутствие маркера sY1192 в присутствии других исследованных маркеров региона AZFc. Данная делеция является наиболее частой среди всех микроделеций Y-хромосомы, и наиболее распространенной частичной делецией AZFc региона среди неотобранных групп мужчин и мужчин с бесплодием из различных популяций, в том числе в Евразии [Repping et al., 2004]. Второе место среди пациентов с СК заняла делеция gr/gr (sY1291), которая также является одной из распространенных частичных делеций данного региона Y-хромосомы. Редкая частичная делеция AZFc, установленная по отсутствию маркеров sY1197 и sY1206, детектирована только у одного пациента с СК, имевшего мозаичный кариотип – 46,XY/47,XXY. Частота делеций AZF среди пациентов данной группы, у которых обнаружен и не обнаружен мозаицизм по половым хромосомам, составила 20% и 14,4%, соответственно.

Среди пациентов с синдромом Клайнфельтера ‘классический’ цитогенетический вариант – регулярная форма дисомии X (кариотип 47,XXY) обнаружена у 87,4% больных. У остальных 10,3% пациентов с СК выявлено наличие гоносомного мозаицизма с наличием эуплоидного клона (46,XX или 46,XY) и Y-позитивного клона(ов) с анеуплоидией по гоносомам, либо наличие полисомии по гоносомам в присутствии Y-хромосомы в кариотипе, у 2,3% пациентов – немозаичная тетрасомия по гоносомам (XXXU, XXYY).

При молекулярно-генетическом исследовании, выполненном у пациентов с синдромом Клайнфельтера, выявлено наличие последовательностей Y-хромосомы во всех случаях. Все пациенты являлись SRY-позитивными мужчинами. Делеции в локусе AZF обнаружены у 15% обследованных пациентов с СК. У 15% пациентов с СК выявлено наличие микроделеций Y-хромосомы в локусе Yq11.23, которые представляли собой частичные делеции региона AZFc. Среди обнаруженных делеций наиболее частым являлась делеция ‘b2/b3’, детектированная у 11% больных СК, и составившая 68,75% от всех обнаруженных микроделеций в данной

группе. На втором месте – делеция 'gr/gr' (18,75%). Частота встречаемости делеций AZF среди пациентов с СК мозаиков и немозаиков была схожей и составила 20% и 14,4%, соответственно.

3.13. Исследование гена андрогенового рецептора (AR) и инактивации X-хромосомы у пациентов с синдромом Клайнфельтера и пациентов с 46,XX тестикулярной формой НФП (синдромом '46,XX-мужчина').

Инактивация хромосомы X (X-chromosome inactivation, XCI) или лайонизация – биологический механизм, с помощью которого уравнивается доза X- и Y-сцепленных генов у млекопитающих. Аномалия лайонизации может влиять на экспрессию X-сцепленных генов, подверженных инактивации, при этом выборочная или преимущественная инактивация одной из родительских X-хромосом может определять экспрессивность X-сцепленных мутаций. Некоторые типы гоносомных мутаций, в частности ряд структурных перестроек хромосомы X, могут оказывать влияние на выбор инактивируемой (отцовской или материнской) X-хромосомы.

Для возникновения X-инактивации требуется наличие в кариотипе двух или более хромосом X (имеющих XCI контролирующий регион – локус Xq13), поэтому в большинстве случаев лайонизация имеет место у женщин. У некоторых мужчин в кариотипе имеется 2, 3 или 4 хромосомы X. Так, в частности у пациентов с синдромом Клайнфельтера или его вариантами, у мужчин с 46,XX-тестикулярной формой НФП (синдром '46,XX-мужчина'), также имеет место лайонизация. В единичных исследованиях других авторов [Vorona et al., 2007] проведен анализ XCI у мужчин с данными формами НФП, при этом полученные результаты свидетельствовали о повышенной по сравнению с контрольной группой (здоровые женщины) частоте встречаемости выборочной лайонизации в данных группах пациентов.

Для изучения характера лайонизации отобрано 91 пациент: 72 – с синдромом Клайнфельтера и 19 – с XX-инверсией пола. С этой целью выполнено исследование локуса андрогенового рецептора (AR/HUMARA), располагающегося вблизи с центром инактивации X-хромосомы: анализ количества CAG-

повторов гена андрогенового рецептора и соотношение инактивированных аллелей X-хромосомы.

Количество CAG-повторов в экзоне 1 гена андрогенового рецептора у пациентов с синдромом Клайнфельтера и с XX-инверсией пола варьировало от 14 до 32 и от 12 до 28, при этом среднее число повторов составило $23,12 \pm 5,42$ и $20,91 \pm 4,46$, соответственно. Это соответствует наиболее распространенным в популяциях аллелям гена *AR*, несущим 21-23 CAG-повтора. Встречаемость аллелей гена *AR* с различным количеством CAG-повторов в экзоне 1 среди обследованных пациентов с СК и 46,XX-мужчин показана на рисунках 59 и 60, соответственно.

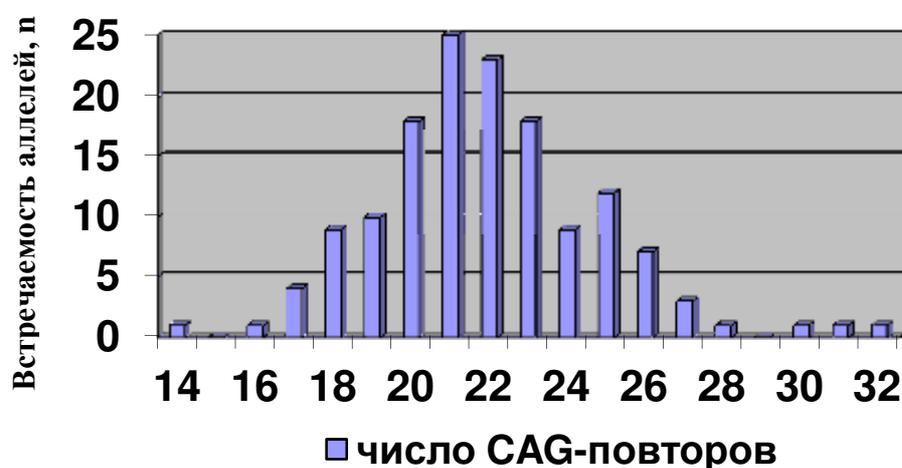


Рис. 59. Встречаемость аллелей гена андрогенового рецептора с различным числом CAG-повтора у 72 пациентов с синдромом Клайнфельтера.

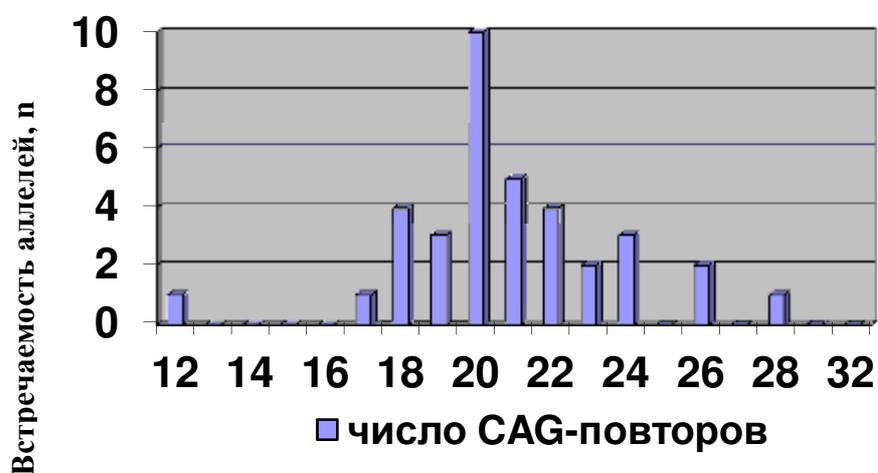


Рис. 60. Встречаемость аллелей гена андрогенового рецептора с различным числом CAG-повтора у 19 пациентов с 46,XX тестикулярной формой НФП.

В целом распределение встречаемости различных CAG-аллелей гена *AR* в обеих группах пациентов близко к нормальному унимодальному распределению с пиком в области 20-21 повтора. “Пропуски” некоторые аллелей, а также аллели с малым или большим числом тринуклеотидных повторов не выявлены из-за небольшой численностью исследованной группы, а также редкой встречаемостью данных аллелей.

Генотипы пациентов СК-гомозигот и гетерозигот по аллелю *CAG AR*, а также генотипы пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП приведены в табл. 37, 38 и 39, соответственно.

Таблица 37

Генотипы 48 пациентов с СК-гетерозигот по числу повторов CAG гена *AR*.

Генотип по аллелю <i>CAG_n AR</i>	Количество случаев, n	Генотип по аллелю <i>CAG_n AR</i>	Количество случаев, n	Генотип по аллелю <i>CAG_n AR</i>	Количество случаев, n
14/17	1	20/21	2	23/24	1
16/22*	1 (b2/b3)	20/22	1	23/25	3
17/20	2	20/23	1	23/26	2
17/26	1	20/24	1	23/27*	1 (b2/b3)
18/20*	1 (b2/b3)	20/26	2	25/27	1
18/21	1	20/28	1	25/32	1
18/22	2	21/22*	3 (1 - gr/gr)		
18/23*	1 (gr/gr)	22/23	2		
19/20	1	22/24	2		
19/21	3	22/25	1		
19/22	2	22/26	2		
19/23	1	22/27*	1 (b2/b3)		
19/24	1	22/30	1		
		22/31	1		

Примечание: *у носителей данных генотипов обнаружены микроделеции Y-хромосомы (указаны в скобках).

Среди 72 обследованных мужчин с синдромом Клайнфельтера гомозиготность по CAG-повтору отмечена у 24 пациентов, а гетерозиготность – у 48 пациентов, что составило 1/3 и 2/3 от мужчин с СК. Наиболее распространенными (с частотой 5% и выше) у мужчин с СК, являлись аллели гена *AR*, содержащие от 18 до 26 CAG

повторов. Частота встречаемости наиболее частых аллелей с числом повторов 20, 21, 22 и 23, составила 12,5%, 17,3%, 16,0% и 12,5%, соответственно. Их доля среди всех аллелей суммарно составила 58,3%.

Наличие высокого числа тринуклеотидных повторов (26 и более) отмечено у 7 из 43 (16,3%) пациентов. Так как наличие 'длинных' CAG-аллелей в гене андрогенового рецептора увеличивает риск нарушения сперматогенеза, можно предполагать, что их наличие, а также избирательная инактивация 'коротких' CAG-аллелей у пациентов с СК может являться дополнительным фактором, нарушающим сперматогенез.

Таблица 38

Генотипы 24 пациентов с СК-гомозигот по числу повторов CAG в экзоне 1 гена *AR* и обнаруженные у них микроделеции Y-хромосомы.

Генотип <i>CAGⁿ AR</i>	Кол-во пациен- тов, n	Доля от гомо- зигот	Кариотип, число пациентов (n)	Микро- делеции Y- хромосомы	Тип AZF делеции, количество, n
18/18	2	8,3%	47,Xder(X)Y (n=1); mos 46,XY/47,XXY (n=1)	0/2	-
19/19	1	4,2%	47,XXY (n=1)	0/1	-
20/20	3	12,5%	mos 46,XY/47,XXY (n=1) 47,XXY (n=2)	1/3	del b2/b3 (n=1) ¹
21/21	8	33,4%	47,XXY (n=1); 48,XXYY (n=1); mos 46,XY/47,XXY (n=1)	1/8	del b2/b3 (n=1) ²
22/22	2	8,3%	47,XXY (n=2)	1/2	del b2/b3 (n=1)
23/23	3	12,5%	47,XXY (n=3)	1/3	del b2/b3 (n=1)
24/24	2	8,3%	47,XXY (n=1)	0/2	-
25/25	3	12,5%	47,XXY (n=2)	0/3	-
Всего:	24	100%		4/24 (16,7%)	del b2/b3 (n=4)

Примечание: ¹ – Делеция обнаружена у пациента с мозаицизмом 46,XY/47,XXY;

² – Делеция обнаружена у пациента с кариотипом 48,XXYY.

Примечательно, что мозаичные формы СК чаще встречали у пациентов-гомозигот по гену *AR*. Так, мозаицизм по гоносомам обнаружен у 5 из 24 (20,8%) и только у 1 из 45 гетерозигот (2,2%). Однако следует отметить, что у 3 из 5 гомозигот мозаицизм был выявлен с только помощью FISH-анализа, и не всем пациентам с синдромом Клайнфельтера выполняли молекулярно-цитогенетическое

исследование. В ряде случаев оно позволяет выявить скрытый минорный гоносомный мозаицизм. Среди выявленных мозаичных гомозигот клон(ы) с анеусомией по хромосоме X в большинстве случаев также был минорным. Очевидно, что мозаицизм по половым хромосомам в этих случаях возник в результате постзиготического нерасхождения гоносом.

Таблица 39

Генотипы 19 пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП по числу повторов CAG в экзоне 1 гена AR.

Генотип по аллелю CAG _n AR	Количество случаев, n	Генотип по аллелю CAG _n AR	Количество случаев, n	Генотип по аллелю CAG _n AR	Количество случаев, n
12/17	1	20/21	3	22/22	1
18/20	3	20/24	2	22/24	1
18/23	1	21/23	1	22/27	1
19/20	2	21/28	1	29/31	1
19/26	1				

Микроделеции длинного плеча Y-хромосомы, частично захватывающие регион AZFc, обнаружены в группе пациентов с СК у 4 из 24 (16,7%) гомозигот (делеция b2/b3, n=4) и у 5 из 48 (10,4%) гетерозигот (делеция b2/b3, n=3, делеция gr/gr, n=2) (табл. 40). Хотя частота микроделечий Y-хромосомы среди гомозигот примерно в 1,5 раза выше, чем у гетерозигот, нам не удалось выявить достоверного различия между данными подгруппами пациентов с СК из-за небольшого размера выборки. Оценку наличия микроделечий локуса AZF у пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП не проводили в связи с отсутствием у них материала длинного плеча Y-хромосомы (см. раздел, посвященный молекулярному анализу Y-хромосомы у пациентов с XX-инверсией пола).

Из 19 обследованных XX-мужчин гетерозиготность по CAG-аллелю X-хромосомы выявлена у 18 (95%) пациентов. Гомозиготность по данному аллелю обнаружена только у одного пациента, имевшего SRY-негативную форму XX-инверсии пола (табл. 39). Вследствие гомозиготности у него нам не удалось установить соотношение инактивации аллелей. Среди пациентов с XX-инверсией пола выявлено 13 различных генотипов, при этом частыми являлись аллели гена андрогенового рецептора, содержащие от 18 до 22 повторов, а также 24 CAG-

повтора, которые были выявлены на 3-10 из 38 исследованных хромосом X, при этом аллель *AR CAG₂₀* обнаружен у 10 из 19 46,XX-мужчин (табл. 39).

В таблицах 41 и 42, соответственно, приведены результаты комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического обследования пациентов с 46,XX-инверсией пола/синдромом 46,XX-мужчина) и пациентов с синдромом Клайнфельтера, которым проведен анализ локуса андрогенового рецептора.

Исследование инактивации X-хромосомы выполнено у 46 пациентов (30 мужчин с синдромом Клайнфельтера и 16 мужчин с 46,XX-инверсией пола), у которых выявлено наличие гетерозиготности по исследованному локусу гена *AR*. Вследствие одинакового количества *CAG* повторов исследование инактивации X-хромосомы (XCI) у гомозигот не проводили. Кроме того, анализ лайонизации не был выполнен у пациентов с гоносомным мозаицизмом, у которых клеточный клон с дисомией X был низкопроцентным, минорным, а также у некоторых гетерозигот по числу *CAG*-повторов в связи с недоступностью биологического материала для исследования. Инактивацию одного из аллелей в 75% клеток и более расценивали как выборочную (преимущественную).

У 28 из 30 (93,3%) СК пациентов-гетерозигот выявлен невыборочный характер лайонизации, при этом соотношение инактивации различных аллелей X-хромосомы (XCI) в большинстве случаев не превышало соотношения 2:1 (67%:33%). Примеры равномерной (48%:52%, пациент 1 – 46,XX-мужчина) и неравномерной инактивации X-хромосомы (20%:80%, пациент 2; и 80%:20%, пациент 3 – мужчины с синдромом Клайнфельтера) приведены на рисунке 61.

Близкая к преимущественная инактивация одной из X-хромосом (70-74%) выявлена у 3 из 30 (10%) обследованных гетерозигот с СК (пациенты AZF1123, AZF2210 и AZF2505). Все из данных пациентов имели регулярную форму СК (кариотип 47,XXY), первичное бесплодие и азооспермию или олигоастенотерозооспермию тяжелой степени (ОАТ III).

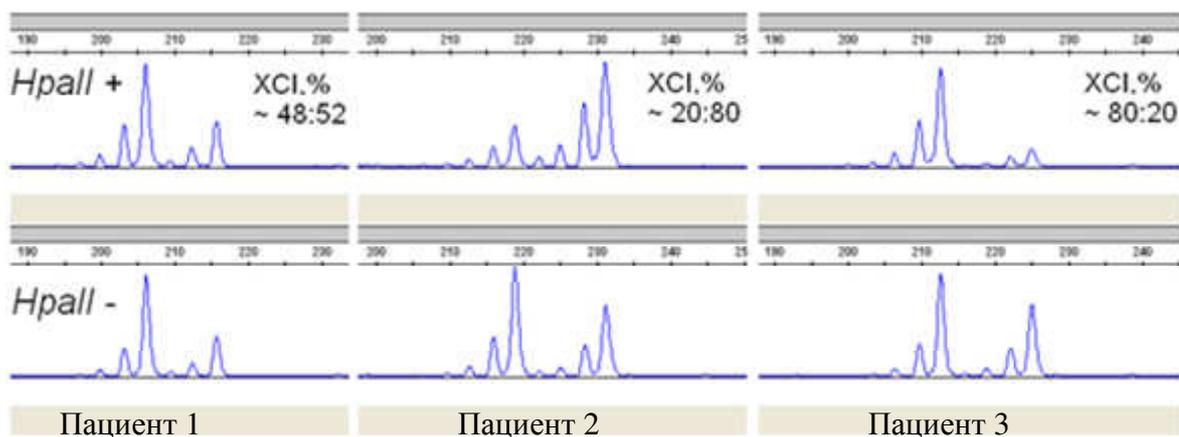


Рис. 61. Результаты анализа инактивации X-хромосомы методом КФ-ПЦР у 3 пациентов. *HpaII*+ фрагмент ДНК локуса САG-повтора в экзоне 1 гена *AR/HUMARA* до рестрикции ДНК соответствующей метил-чувствительной рестриктазой; *HpaII*- – после рестрикции.

Неслучайный характер лайонизации (с соотношением инактивации X-хромосом 75%:25% и более) выявлен у 5 из 16 XX-мужчин, при этом у двух из них отмечали экстремально выборочно инактивацию X-хромосомы (>90%:10%). Выборочная инактивация одной из X-хромосом с соотношением 75%:25% и более обнаружена у 5 из 16 (31,25%) обследованных мужчин с XX-инверсией пола у 2 из 30 (6,67%) пациентов с синдромом Клайнфельтера, имеющих регулярную форму СК (кариотип 47,XXY), у одного обнаружена частичная делеция AZFc региона -gr/gr. Экстремально неравномерная – выборочная инактивация одной из X-хромосом более чем в 90% клеток обнаружена только у 2 из 19 (10,5%) мужчин с 46,XX-тестикулярной формой НФП. У одного из них выявлена SRY- 46,XX-инверсия пола и неполная маскулинизация (пациент AZF2049; XCI - 9%/91%), у другого – SRY+ XX-инверсии пола с полной маскулинизацией (пациент AZF708; XCI - 95%/5%). Пациент AZF708 имел сложный гоносомный мозаицизм 45,X/46,XX/47,XXX, с различным числом (1-3) X-хромосом, несущих фрагмент короткого плеча Y с геном SRY, данный случай детально описан в разделе обследования мужчин с XX-инверсией пола.

Примечательно, что преимущественно была инактивирована материнская хромосома, тогда как дериватная (*SRY*-несущая) хромосома X избегала инактивации. Кроме того, у пациента был обнаружен сложный гоносомный мозаицизм с тремя клеточными клонами, несущими 1 или 2 дериватных (*SRY*-несущих) X-хромосом (рис. 41).

Таблица 40

Результаты комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического обследования 100 пациентов с синдромом Клайнфельтера.

Кариотип	Кол-во больных	del AZF	AR CAG		Инактивация X-хромосомы (XCI), число случаев (n)
			Гомозиготы	Гетерозиготы	
47,XXY	63	7 (del b2/b3)	17	45	Выборочная/преимущественная (n=2); близко к преимущественной (n=3); равномерная/невыборочная (n=22); не исследовали (n=18)
mos 46,XY/47,XXY	3(2*)	1 (del b2/b3)	4	-	не исследовали
mos 47,XXY/48,XXXXY/46,XY*	1	-	1	-	не исследовали
mos 46,XX/47,XXY	1	-	-	1	равномерная
47,XXY,t(3;8)(q23;p21)	1	-	-	1	равномерная
47,XY,+derX	1	-	1	-	не исследовали
48,XXYY	1	1 (del b2/b3)	1	-	не исследовали
48,XXXYY	1	-	-	1	равномерная
Всего:	72	9 (12,5%)	24	48	Выборочная/преимущественная 2 из 30 случаев

Примечание: * - мозаицизм выявлен при FISH-анализе, по данным стандартного цитогенетического исследования кариотип был определен как немозаичный (47,XXY).

Таблица 41

Результаты комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического обследования у 21 пациентов с XX-инверсией пола.

Кариотип	Кол-во больных	SR γ	Класс (Yp+) XX-мужчин	AR CAG		Инактивация X-хромосомы (XCI), число случаев (n)
				Гомозиготы	Гетерозиготы	
45,X ¹	1	+	Класс I	1 (гемизигота)	0	-
46,XX	2	+	Класс I	0	2 (20/24) (22/27)	преимущественная (n=1); равномерная (n=1)
46,XX	2	+	Класс II	1 (22/27)	1 (20/21)	преимущественная (n=1); не исследовали (n=1)
45,X ¹	1	+	Класс III	1 (гемизигота)	0	-
46,XX	11	+	Класс III	0	11	преимущественная (n=1); равномерная/ невыборочная (n=7); не исследовали (n=3)
mos 45,X/46,XX/47,XXX ²	1	+	Класс III	0	1 (18/23)	преимущественная (n=1)
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	1	+	Класс III	0	1 (19/26)	равномерная (n=1)
46,XX	2	-	-	0	2 (18/20) (20/21)	преимущественная (n=1); равномерная (n=1)
Всего:	21	SR γ +, n=19; SR γ -, n=2		3	18	Выборочная, преимущественная 5 из 16 случаев

Примечание: ¹ - (первичный) кариотип по данным стандартного цитогенетического исследования 45,X;

² - (первичный) кариотип по данным стандартного цитогенетического исследования 46,XX.

У 2 (13%) SRY+ пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП и у 3 (10%) мужчин с синдромом Клайнфельтера соотношение XCI было близким (75%:25%-79%:21%) к выбранному значению аномальной X-инактивации (XCI 80%:20% и выше). Если учитывать и этих пациентов, то преимущественная инактивация одного из аллелей X-хромосомы в данных группах мужчин составила примерно 27% и 13%, соответственно. Хотя встречаемость выборочной инактивации X-хромосомы примерно в 2 раза была выше у мужчин с XX-тестикулярной формой НФП по сравнению с пациентами с СК, размер выборки не позволил статистически оценить достоверность данного различия.

Не выявлено зависимости степени (%) инактивации CAG-аллеля от длины тринуклеотидного повтора. Среди 45 пациентов только у 1 пациента с СК соотношение XCI было равным 50%:50%. Среди остальных 44 обследованных у 24 пациентов отмечали более высокий процент инактивации аллеля, несущего короткий, а у 20 пациентов – более высокую частоту инактивации аллеля, несущего длинный повтор. У 7 из 10 мужчин, у которых соотношение XCI составило 75%:25% и выше, более часто был инактивирован аллель с меньшим числом повторов. Однако нами не выявлено ассоциации длины данного тринуклеотидного повтора гена AR и частотой X-инактивации, различия были недостоверными ($p>0.05$).

Нами не отмечена ассоциация наличия микроделеций Y-хромосомы с гомо- или гетерозиготностью по CAG-аллелю андрогенового рецептора. Среди пациентов с СК, имеющих микроделеции в регионе AZFc у трех пациентов выявлена гомозиготность и у двух гетерозиготность по данному локусу гена AR, в одном случае анализ числа повторов не был проведен из-за недоступности материала.

Наличие ‘высокого’ числа тринуклеотидных повторов (26 и более) отмечено у 7 из 43 (16,3%) пациентов с синдромом Клайнфельтера. Так как наличие ‘длинных’ CAG-аллелей в гене андрогенового рецептора увеличивает риск нарушения сперматогенеза, можно предполагать, что их наличие, а также избирательная инактивация ‘коротких’ CAG-аллелей у пациентов с СК может являться дополнительным фактором, нарушающим сперматогенез.

Таким образом, результаты исследование характера лайонизации у пациентов с синдромом Клайнфельтера и 46,XX-мужчин свидетельствовали об относительно частой встречаемости аномальной (выборочной) инактивации X-хромосомы (XCI), особенно среди мужчин с XX-инверсией пола. Сравнение частоты встречаемости неравномерной инактивации X-хромосомы у пациентов с СК и пациентов с XX-инверсией пола не выявило различий в частоте неравномерной XCI между данными группами. Однако экстремально выборочный характер лайонизации был обнаружен нами только в группе пациентов с XX-инверсией пола. Выявлена более высокая встречаемость микроделеций Y-хромосомы (частичных делеций региона AZFc) у СК пациентов с мозаицизмом-гомозигот по числу CAG-повторов в экзоне 1 гена AR (20,8%) по сравнению с пациентами СК-мозаиками-гетерозиготами по хромосоме X (2,2%), что требует дальнейшего изучения на более крупных выборках пациентов.

3.14. Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследования пациентов с дисомией или полисомией Y.

Среди обследованных пациентов с мутациями Y-хромосомы выявлены 23 пациента, имеющие дисомию или полисомию Y (табл. 42). Некоторые входили в описанные выше клинические группы (СШТ, XY-дисгенезия гонад, синдром Клайнфельтера, пациенты мужского пола с мозаицизмом по Y-хромосоме). Среди них 21 пациент имели мужской пол и 2 – женский. Последние две пациентки также имели дисомию Y или мозаицизм по половым хромосомам с наличием клона с дисомией и/или трисомией Y, поэтому их также включили в данную группу, но рассматривали отдельно. Среди обследованных данной группы 15 пациентов являлись взрослыми, 7 – детьми, из них 1 пациент обследован в пренатальный и постнатальный период, и 1 плод (беременность прервана в связи с обнаружением хромосомной мутации). Возраст 20 пациентов данной группы варьировал от 1 до 42 лет (у 2 взрослых мужчин сведения об их возрасте отсутствовали).

Из всех выявленных случаев Y-дисомии/полисомии 21 диагностированы постнатально, а в двух случаях (A1517.1, AZF1306) – в ходе пренатальной диагностики. В одном из последних случаев - при проведении ультразвукового

исследования выявлены множественные пороки развития у плода мужского пола (A1517.1). С помощью молекулярно-генетического исследования (методом КФ-ПЦР) на наличие частых анеуплоидий у него обнаружено наличие 2 дополнительных хромосом в кариотипе: трисомии по хромосоме 13 и трисомии по гоносомам - XY₃, что может соответствовать кариотипу 48,XY₃,+13. Учитывая наличие тяжелой хромосомной патологии у плода, после медико-генетического консультирования супружеская пара приняла решение о прерывании беременности. Результаты КФ-ПЦР данного случая, а также мужчины с регулярной дисомией Y (AZF2362) приведены на рисунках 62 и 63.

В другом случае (пациент AZF1306) в ходе пренатального цитогенетического исследования (анализ кариотипа клеток ворсин хориона) обнаружена регулярная форма дисомии Y. Учитывая благоприятный прогноз и отсутствие пороков развития, супружеская пара приняла решение о сохранении беременности. После рождения выполнено цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование, которое позволило обнаружить сложный гоносомный мозаицизм с наличием клеточных линий, несущих различное количество (от 0 до 4) хромосом Y, при этом преобладал клон с тетрасомией Y (см. ниже детальное описание данного клинического случая и результаты обследования пробанда и его отца).

Причинами обращения для медико-генетического обследования у пациентов детского возраста являлись задержка психомоторного и/или полового развития. Из них у двух больных выявлены генетические нарушения, не связанные с мутациями Y-хромосомы: синдромы Клайнфельтера (AZF1762) и Ангельмана (П.Г., 2370).

В большинстве случаев причинами обращения для обследования у взрослых пациентов с дисомией Y являлись бесплодие, либо невынашивание в браке. Среди них 16 мужчин – обратились по поводу первичного или вторичного бесплодия, невынашивания в браке, 1 мужчина – по поводу планирования беременности, 1 мужчина – для медико-генетического консультирования по поводу кровнородственного брака. В последнем случае у его супруги уже наступила беременность естественным путем, срок 6 недель.

Таблица 42

Данные обследования пациентов с дисомией или полисомией Y.

№	Код пациента	Возраст, лет	Пол	Диагноз	Кариотип	SRУ	Делеция AZF
1	AZF2278	41	М	Б1, азооспермия	47,XYУ	+	b2/b3
2	AZF2362	34	М	Б1, олигозооспермия III ст.	47,XYУ	+	-
3	AZF3331	40	М	БП, метаболический синдром, ожирение (рост 195 см., вес 160 кг), олигозооспермия II ст.	47,XYУ	+	b2/b3
4	AZF5032	26	М	Кровнородственный брак, у супруги беременность 6 недель, естественным путем. Астенозооспермия.	47,XYУ	+	-
5	Х.Р.	35	М	Б1, азооспермия. Гипергонадотропный гипогонадизм, гипоплазия яичек	47,XYУ	+	-
6	М.Э. (24331)	30	М	Б1, олигозооспермия II ст., астенотератозооспермия	47,XYУ	+	-
7	С.А. (17459)	26	М	Б1, олигозооспермия, подозрение на синдром Клайнфельтера	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
8	Г.Н.	32	М	Б1	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
9	Т.Д. (22389)	37	М	Б1	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
10	К.Р. (12789)	25	М	Б1, азооспермия	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
11	З.Д. (13290)	39	М	Б1, олигозооспермия	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
12	К.Р.(11589)	Взрослый	М	Б1	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
13	AZF3035	Взрослый	М	Б1	mos 47,XYУ[10]/46,XY[5]	+	-
14	AZF5450	21	М	Дисплазия скелета, высокий рост, стигмы дизэмбриогенеза. Сниженный интеллект, особенности поведения. Не женат, детей нет.	47,XYУ, nuc ish (DXZ1×1,DYZ3×2) [200] arr Yp11.31q11.23 (2650140-28799937)×2	+	-
15	П.Г. (2370)	1	М	Синдром Ангельмана, ЗППР	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
16	К.О. (1577)	13	М	Задержка полового развития	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
17	A1517.1	-	М	Плод с МВПР	48,XYУ,+13	+	Н.и.
18	AZF1762	8	М	Синдром Клайнфельтера, ЗППР	48,XXYУ	+	b2/b3
19	SRY176	14	М	Задержка полового развития, гипергонадотропный гипогонадизм	mos 45,X[20]/47,XYУ[1]/46,XY[3], nuc ish (DXZ1×1)[645]/ (DXZ1×1,DYZ3×1)[170]/ (DXZ1×1,DYZ3×2)[80]/ (DXZ1×1,DYZ3×3)[5]	+	b2/b4 (AZFc)

№	Код пациента	Возраст, лет	Пол	Диагноз	Кариотип	SRУ	Делеция AZF
20	AZF1182	16	М	Первичный гипогонадизм	mos 45,X/46,XY/47,XYУ	+	-
21	AZF1306 (К.К.)	1	М	Перинатальное гипоксически-ишемическое поражение ЦНС. Сигмы дизэмбриогенеза: покатый назад лоб, сглаженная переносица, микроретрогнатия. Развитие гениталий по мужскому типу, яички в мошонке, пенис.	47,XYУ[11] (хорион). Постнатально: 45,X[6]/49,XYУУУ[19], nuc ish (DXZ1×1)[106]/ (DXZ1×1, DYZ3×1)[6]/(DXZ1×1, DYZ3×2)[35]/(DXZ1×1 DYZ3×3)[71]/(DXZ1×1 DYZ3×4)[282](лимфоциты); nuc ish(DXZ1×1)[2]/(DXZ1×1, DYZ3×1)[4]/(DXZ1×1, DYZ3×2)[14]/ (DXZ1×1 DYZ3×3)[43]/(DXZ1×1 DYZ3×4)[137](буккальный эпителий)	+	b2/b3 (унасле- дована от отца)
22	А.Н.	12	Ж	Дисгенезия гонад, аменорея I. СШТ?	47,XYУ	Н.и.	Н.и.
23	Г.В.	20	Ж	СШТ, дисгенезия гонад, гипоплазия матки, аменорея I. Низкий рост (146,5 см), вес 48 кг. Гипертелоризм, эпикант, гипетрихоз, короткая шея, гипертелоризм сосков, подковообразная почка.	46,XYУ,der(13;14)(q10;q10); первичный (?) - 46,X,der(13;14)(q10;q10),mat,mat, nuc ish (DXZ1×1)[137]/(DXZ1×1 DYZ3×2)[163], т.е. выявлены 2 клона клеток: в 46% - 44,X,der(13;14)(q10;q10) и в 54% - 46,XYУ,der(13;14)(q10;q10)	Н.и.	Н.и.

Примечание: Н.и. – не исследовали.

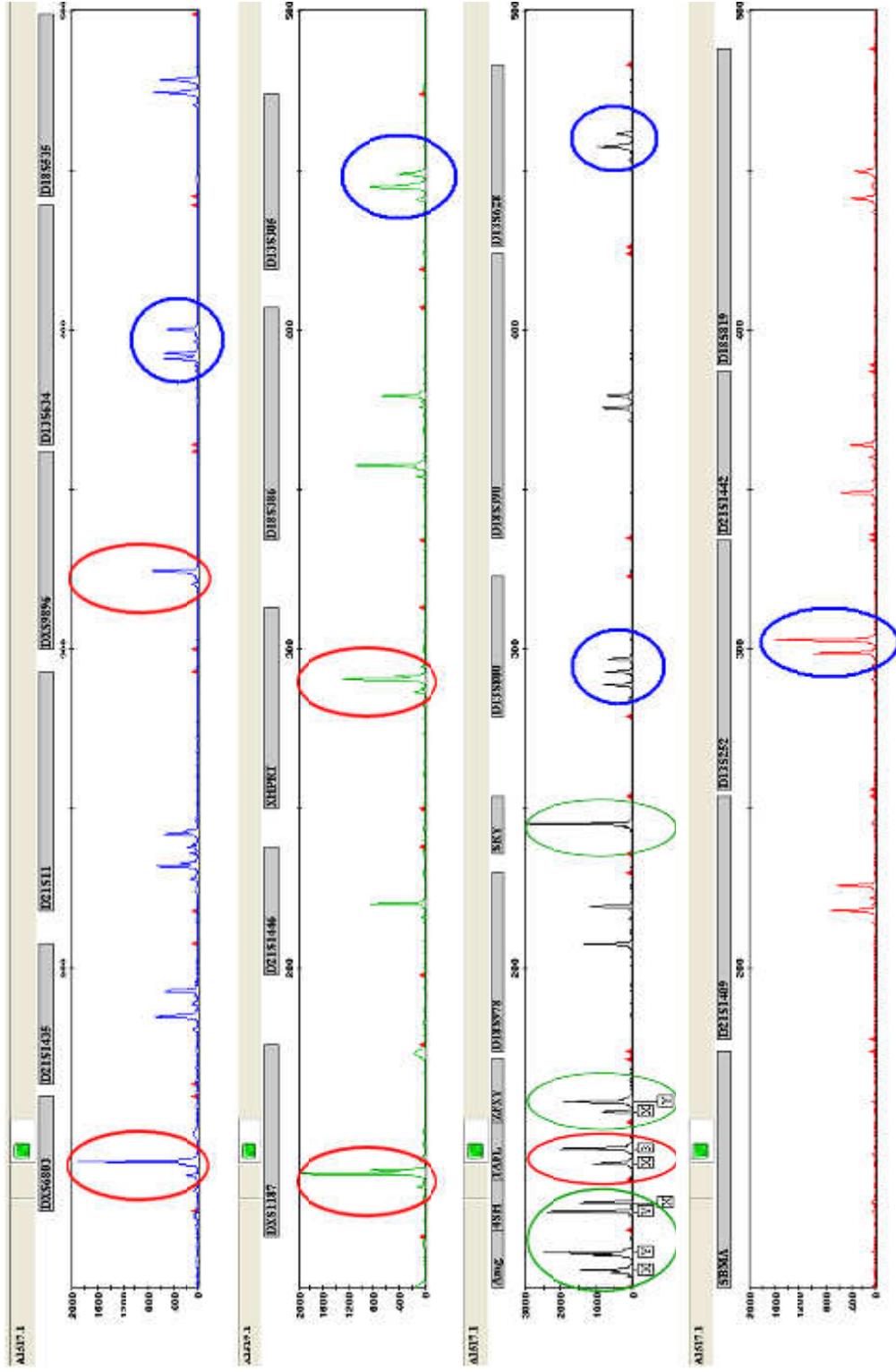


Рис. 61. Результаты КФ-ПЦР анализа у плода (A1517.1) с регулярной формой дисомии Y и трисомией 13 (кариотип 48,XYY,+13). Обведенные цветными эллипсами: красными и зелеными - маркеры хромосом X и Y, представленные в геноме в 1 или 2 копиях; синими - маркеры хромосомы 13, представленные в 3 копиях.

По данным спермиологического обследования, выполненного у 9 пациентов, диагностированы следующие формы патозооспермии: азооспермия, n=3, олигозооспермия различной степени, n=5, астенозооспермия, n=1 (у фертильного пациента).

Один из взрослых пациентов (код AZF5450, 21 год) с дисомией Y в браке не состоял, детей не имел. Причиной его обращения для медико-генетического обследования являлось проблемы в психоэмоциональной сфере и поведении. У данного пациента отмечен высокий рост, признаки дисплазия скелета, и некоторые особенности поведения, и сниженный интеллект. Спермиологическое исследование у данного пациента не проводили. Несбалансированных хромосомных перестроек у него не было обнаружено при анализе микроделеций Y-хромосомы, а также по данным микроматричного анализа хромосом (aCGH). Происхождение дисомии Y было установлено в данном случае как *de novo*, так как у отца пробанда выявлен нормальный мужской кариотип – 46,XY. Также происхождение полисомии Y как *de novo* установлено у пациента с мозаичной формой тетрасомии Y, у отца пробанда также был обнаружен нормальный мужской кариотип – 46,XY.

По данным цитогенетического и/или молекулярного обследования кариотип 47,XY² – регулярная дисомия Y без наличия мозаицизма и аномалий других хромосом выявлена у 16 из 24 (66,7%) индивидуумов данной группы. У остальных 8 пациентов с анеусомией Y обнаружены гоносомный мозаицизм (n=4), структурные или численные мутации аутосом (n=2) или их сочетание (n=1), наличие дополнительной хромосомы X (n=1).

Ниже приведено описание клинического случая пациента с тетрасомией Y – наиболее необычного клинического случая в данной группе.

Клинический случай 13.

Пациент К.К. (AZF1306), мальчик в возрасте 1 года, рожденный от второй беременности. Матери к моменту родов 27 лет. Первая беременность наступила после 2 лет отсутствия беременности в браке, и закончилась самопроизвольным выкидышем на сроке 4-5 недель беременности. Вес ребенка при рождении 2780 г, рост 50 см, окружность головы 30 см. Вторая беременность (пробандом) наступила на фоне приема матерью дексаметазона, комбинированных эстроген-

гестагенных и антиандрогенных препаратов в связи с лечением синдрома поликистозных яичников. Отец пробанда фенотипически нормальный, здоровый мужчина 28 лет. По данным спермиологического исследования у него диагностирована астенотератозооспермия умеренной степени. Родители пробанда имеют нормальный кариотип.

Во время беременности было проведено цитогенетическое исследование в связи с выявлением у плода ряда стигм нарушения эмбриогенеза, обнаруженных при УЗИ плода (покатый назад лоб, сглаженная переносица, микроретрогнатия и деформированный пенис). По результатам анализа хромосомных препаратов, полученных из ворсин хориона, обнаружен немозаичный кариотип – 47,XYU[11].

У пациента было диагностировано перинатальное гипоксически-ишемическое поражение ЦНС. При рождении у пациента были отмечены ряд стигм дизэмбриогенеза: покатый назад лоб, сглаженная переносица, микроретрогнатия. Развитие гениталий по мужскому типу, яички находились в мошонке, пенис деформирован. УЗИ органов брюшной полости и офтальмологическое исследование не выявило какой-либо дополнительной патологии.

Постнатально проведенное цитогенетическое исследование (анализ кариотипа по лимфоцитам периферической крови) выявило мозаицизм 45,X[6]/49,XYYYU[19]. FISH анализ позволил обнаружить наличие у пробанда сложного мозаицизма. Следующие пять клонов были обнаружены: 45,X (21,2%), 46,XY (1,2%), 47,XYU (7%), 48,XYYYU (14,1%) и 49,XYYYU (56,5%) (рис. 64). Кроме того, при молекулярно-генетическом исследовании микроделеция Y-хромосомы в регионе AZFc (локус Yq11.23) обнаружена у пробанда и его отца (не показано).

В данном случае, с учетом того, что родители пробанда имели нормальный кариотип, а также результатов пренатального цитогенетического исследования, наиболее вероятно, что зигота имела кариотип 47,XYU вследствие оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом с Y-дисомией. Однако впоследствии вследствие постзиготического нерасхождения гоносом возник сложный мозаицизм с наличием различного числа хромосом Y.

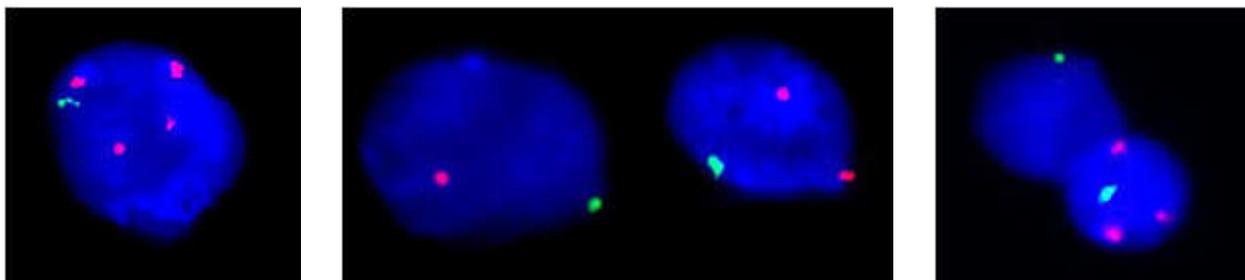


Рис. 64. Интерфазный анализ FISH с пробами DXZ1 (зеленый) и DYZ3 (красный) у пациента К.К. выявил сложный мозаицизм по Y: X/XY/XYY/XYYY/XYYYY.

Результаты исследования анеуплоидии в сперматозоидах отца не выявили значимого повышения уровня анеуплоидии по гоносомам, при этом частота дисомии YY составила 0,08%, что свидетельствует о том, что риск рождения мальчика с кариотипом 47,XYY, вероятно, не был повышен у отца пробанда (см. ниже табл. 53).

Среди 12 обследованных мужчин с дисомией (n=9) или полисомией Y (n=3), которым был проведен поиск микроделечий Y-хромосомы, 'классические' AZF делеции обнаружены только у одного пациента (SRY176). Еще у 4 (2 мужчин с дисомией Y и 2 пациентов с полисомией по гоносомам) выявлено наличие частичных делеций AZFc – del b2/b3 (табл. 42). По крайней мере, в одном случае (пациент AZF1306), микроделеция Y-хромосомы унаследована от отца. У одного из мужчин (AZF2278) выявлено первичное бесплодие вследствие секреторной азооспермии, у другого - пациента AZF3331, имевшего делецию b2/b3, отмечали вторичное бесплодие, метаболический синдром, ожирение и олигозооспермию средней тяжести.

Таким образом, большинство индивидуумов с дисомией/полисомией Y имеют мужской фенотип, но в редких случаях аномалии развития половой системы данные мутации Y-хромосомы встречаются у пациентов с женским фенотипом, имеющих нарушение формирования пола. В этих случаях пациентки с дисомией/полисомией Y имеют дисгенезию гонад (вероятно, из-за микроструктурных мутаций или точковых мутаций генов, контролирующую дифференцировку гонад по мужскому типу), в случае гоносомного мозаицизма с наличием клона с моносомией X – наличие синдрома Шерешевского-Тернера или его вариантов. У пациентов с дисомией/полисомией Y, которым проведен молекулярный анализ Y-хромосомы, обнаружено наличие гена SRY. Частота

микроделеций в локусе AZF у пациентов мужского пола с дисомией или полисомией Y составила 45,5%, при этом наличие 'классической' AZFc делеций – del b2/b4 обнаружено только в одном случае, в 4 случаях – выявлено наличие частичной делеции региона AZFc – del b2/b3.

3.15. Молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование мужчин с аутосомно-гомосомными транслокациями.

Молекулярный анализ Y-хромосомы выполнен у 14 пациентов мужского пола, имеющих аутосомно-гомосомные транслокации. Данные обследования пациентов данной группы приведены в таблице 43.

Среди обследованных индивидуумов данной группы 13 пациентов являлись взрослыми мужчинами в возрасте от 23 до 44 лет (точные сведения о возрасте отсутствовали у 3 взрослых мужчин с бесплодием), которые обратились для медико-генетического обследования и консультирования по поводу первичного бесплодия в браке, один пациент – мальчик М.Д., 4 лет (SRY206), направленный для цитогенетического обследования по поводу задержки роста и нарушения психомоторного развития.

Взрослые пациенты с аутосомно-гомосомными транслокациями являлись фенотипически нормальными мужчинами, не имеющих аномалий формирования пола и пороков развития, а также умственной отсталости. По результатам стандартного спермиологического исследования, проведенного у них, отсутствие сперматозоидов в эякуляте (азооспермия) установлено у 8 пациентов, у 3 мужчин обнаружено наличие единичных сперматозоидов в эякуляте (олигозооспермия тяжелой степени или криптозооспермия), у двух из которых впоследствии диагностировали секреторную азооспермию, и только в одном случае – у пациента с кариотипом 46,XY,t(14;Y)(p12;q12) выявлена нормозооспермия. Спермиологическое исследование не проводили у одного взрослого пациента (AZF513) с направляющим диагнозом 'первичное бесплодие' вследствие недоступности биологического материала для проведения соответствующего исследования.

Среди пациентов данной группы X-аутосомные транслокации с вовлечением хромосомы X и аутосомы (хромосомы 4, 5, 6, 7) обнаружены у 4 больных (AZF513,

AZF2181, AZF6397, 19256), а Y-аутосомные транслокации с вовлечением хромосомы Y и аутосомы (хромосомы 1, 5, 8, 14, 15, 20, 21, 22) – у 9 пациентов, и в одном случае обнаружена сложная перестройка с вовлечением хромосом 18, X и Y (SRY206). В одном случае (М.Г.) Y-аутосомная транслокация характеризовалась редкой аномалией – «45,X-мужчина», однако в отличие от другого пациента с первичным кариотипом 45,X (SRY152) из группы пациентов с XX-инверсией пола, описанного выше, транслокация материала Yp11 произошла не на хромосому X, а на хромосому 22. Очевидно, что дериватная хромосома, также как в случае больного SRY152, несла ген *SRY*, но, у пациента М.Г. не было мозаицизма по aberrантной хромосоме.

Из 10 исследованных транслокаций с вовлечением аутосомы и Y-хромосомы точки разрыва располагались в ее коротком плече (в локусах Yp11.2-p11.3) у 4 пациентов и у 5 в длинном плече (в локусах Yq11.2-Yq12), в одном случае (AZF74) точки разрыва не удалось определить. У обоих пациентов с точками разрыва в коротком плече Y-хромосомы не обнаружено потери ее Y-специфичного материала. Однако у них выявлено выраженное нарушение сперматогенеза – секреторная азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени. Рост обоих был в пределах нормы, что свидетельствует о том, что точка разрыва в Yp11.3, по-видимому, располагалась дистальнее локуса *SHOX* (*Short stature homeobox gene*) – кодирующего гомеобоксный X-Y гомологичный ген, потеря или мутации которого ответственны за низкий рост.

У пациента (код 837) с кариотипом 45,X,-Y,der(5)t(5;Y)(p15.3;p11.3) и азооспермией отсутствовали пороки развития и не отмечали умственной отсталости. Это свидетельствует о том, что у него точка разрыва в коротком плече хромосомы 5 располагалась в дистальной ее части, предположительно локус 5p15.33.

У другого пациента, являющегося носителем Y-аутосомной транслокации с точкой разрыва в коротком плече Y-хромосомы, хромосомная перестройка возникла в результате реципрокной транслокации между хромосомами 1 и Y, являлась сбалансированной, т.е. без потери хромосомного материала.

Данные обследования пациентов мужского пола с аутосомно-госомными транслокациями.

№	Код пациента	Возраст, лет	Клинический диагноз	Спермиологический диагноз	Кариотип	SR Y	Делеция AZF
1	AZF1777	23	Бесплодие I	ОАТ III	46,X,t(Y;1)(p11.3;p34)	+	-
2	837 (16311)	26	Бесплодие I	азооспермия	45,X,-Y,der(5)t(5;Y)(p15.3;p11.3)	+	-
3	AZA6248	32	Бесплодие I	азооспермия	46,XY,t(Y;8)(q11.2;q11.2), ish t(Y;8)(DYZ3+,DYZ1+,DYZ3-,DYZ1+)	+	-
4	Н.Н.	Н.д.	Бесплодие I	нормозооспермия	46,X,t(Y;14)(q12;p12)	+	-
5	AZF1619	Н.д.	Бесплодие I	азооспермия	46,X,der(Y) - первично; 46,X,t(Y;15)(q12;q24) - повгорно	+	-
6	М.Д. (SRY206)	4	МВПР, задержка роста и ЗПМР	-	45,X,t(Y;18)(p11.1;p11.1), ish psu dic(18;Y)t(Y;X;18)(q12;p?;p11.1)	+	del b2/b3
7	13326	35	Бесплодие I	азооспермия	46,X,t(Y;20)(q11.21;p13)	+	-
8	26822	38	Бесплодие I	азооспермия	46,X,t(Y;21)(q11.2;q22.3)	+	-
9	AZF74	31	Бесплодие I	ОАТ III	45,X,-Y,der(22)t(Y;22)(?:?)	+	-
10	М.Г.	42	Бесплодие I	азооспермия	45,X,der(22)t(Y;22)(p11;p12), ish der(22)(p11;p12)(DXZ1+SR Y+)[20], nuc ish(DXZ1×1)(SRY×1)[20]	+	del AZFa+b+c (нет проксимальной части Yp11, Ycen, и Yq)
11	19256	33	Бесплодие I	ОАТ III→азооспермия	46,Y,t(X;4)(p22.1;q12)	+	-
12	AZF513	Н.д.	Бесплодие I	Н.д.	46,Y,t(X;5)(q24;q33.2)	+	-
13	AZF2181	44	Бесплодие I	азооспермия	46,Y,t(X;6)(q13;p22)	+	-
14	AZF6397	30	Бесплодие I	азооспермия	46,Y,t(X;7)(q26;q21.2)	+	del b2/b3

Примечания: Н.д. – нет данных. МВПР – множественные врожденные пороки развития. ЗПМР – задержка психомоторного развития. ОАТ III – олигоастенотератозооспермия тяжелой степени.

С помощью ПЦР-анализа установлено, что все пациенты данной группы являлись *SRY*-позитивными. Анализ микроделеции *Y*-хромосомы свидетельствовал, что у 45,X-мужчины с транслокацией (*Y*;22) отсутствовал локус *AZF*. Это обусловлено расположением точки разрыва в коротком плече *Y*-хромосомы, и транслокацией только дистальной части *Yp11*. У остальных пациентов нами не обнаружено ‘классических’ *AZF* делеций, а также частичных делеций его регионов *AZFa* и *AZFb*.

Частичные *AZFc* делеции детектированы у 2 из 14 мужчин с аутосомно-гомосомными транслокациями: у 1 из 8 мужчин с *Y*-аутосомными транслокациями, и у 1 из 4 мужчин с *X*-аутосомными транслокациями. У одного из пациентов данной группы с делецией *b2/b3* обнаружена сложная транслокация с вовлечением хромосом 18, *X* и *Y*. Ниже приведено описание данного клинического случая.

Клинический случай 14.

Пациент, М.Д. (SRY206), мальчик 4 лет (рис. 65). Родители больного обратились для медико-генетического обследования и консультирования в ФГБНУ «МГНЦ» по поводу задержки роста и психомоторного развития у пробанда. При клинико-генетическом обследовании у больного помимо задержки роста (94см) выявлен комплекс черепно-лицевых дисморфий: микроцефалия (объем головы – 48см), широкая переносица, гипертелоризм, птоз, короткий фильтр, короткие вывернутые ноздри, рот “купидона”, кариес, микрогнатия, диспластичные оттопыренные уши, короткую шею, низкую линию роста волос, брахидактилию, левосторонний сколиоз. Развитие половых органов по мужскому типу. По данным ультразвукового исследования какой-либо патологии внутренних органов брюшной полости не выявлено.

По данным стандартного цитогенетического исследование (GTG-окрашивание) кариотип пациента определен как 45,X,t(*Y*;18)(*p11.1;p11.1*)dn. Кариотипы родителей нормальные.



Рис. 65. Фенотип пациента М.Д. (SRY206).

Для уточнения цитогенетического диагноза пациенту проведено повторное цитогенетическое исследование с последующим молекулярно-цитогенетическим и молекулярно-генетическим исследованием. В результате проведенного повторного исследования кариотип пробанда подтвержден и дериватная хромосома интерпретирована как продукт возникшей *de novo* транслокации хромосом Y и 18. Для уточнения перестройки проведен FISH-анализ с использованием различных ДНК-зондов (рис. 66, 67).

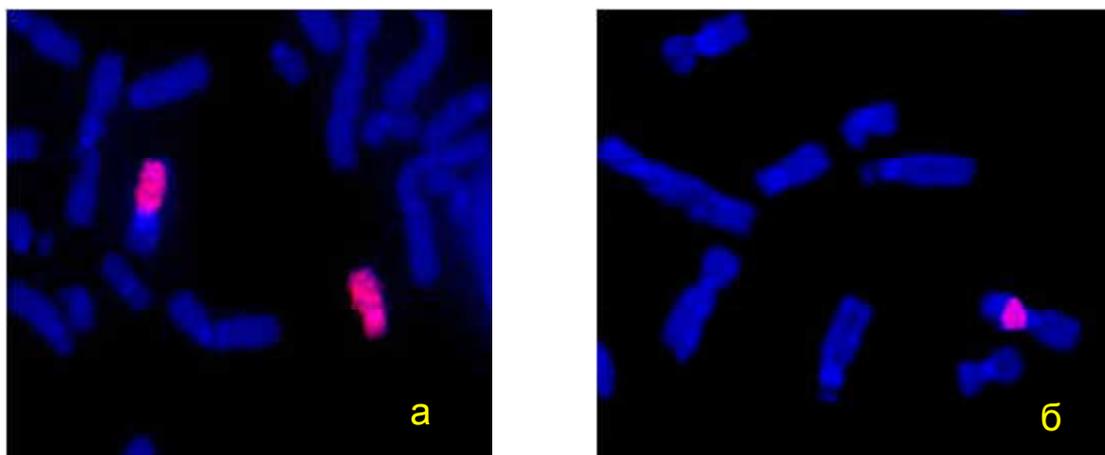


Рис. 66. Результат гибридизации с WCP18, WCP Y ДНК-зондами.

Примечание: Дериватная хромосома содержит материал хромосом 18 (WCP 18+) и Y (WCP Y+), изображены на фото слева (а) и справа (б), соответственно.

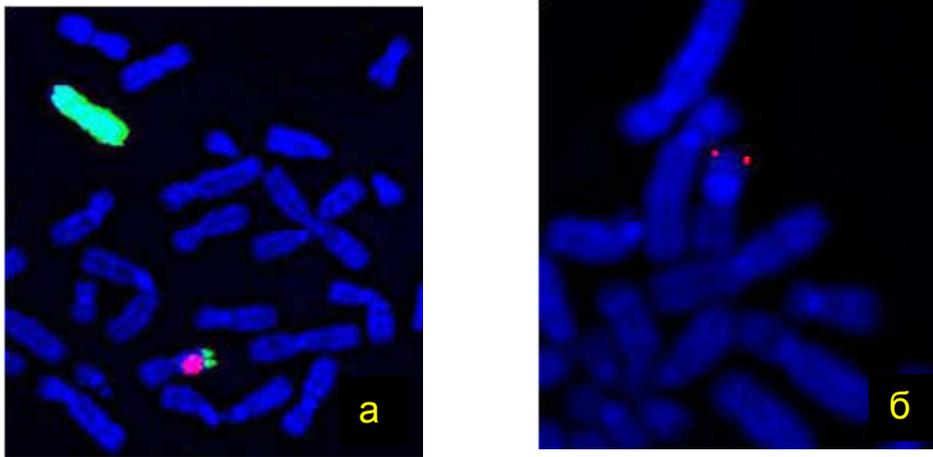


Рис. 67. Результат гибридизации с WCP X, WCP Y и LSI SRY ДНК-зондами. Дериватная хромосома содержит материал хромосом X (WCP X+) и Y (WCP Y+) и SRY локус.

Установлено, дериватная хромосома содержит материал хромосом 18 и Y, что подтвердило исследование с цельнохромосомными зондами WCP18, WCPY. Однако, неожиданным было обнаружение DAPI-положительного материала в терминальном районе дериватной хромосомы (рис. 68). Для идентификации этого района при последующем FISH-анализе использовали WCPX и LSI SRY ДНК-зонды. В терминальном районе дериватной хромосомы SRY-сигнал располагался непосредственно дистальнее X-сигнала в теломерном районе X-хромосомы (рис. 67). Выявленная локализация SRY-локуса на участке X-хромосомы позволила установить, что в дериватной хромосоме присутствует материал короткого плеча X-хромосомы, предположительно дистальный район Xp22.3.

Для идентификации центромерного района дериватной хромосомы с помощью FISH-метода проведено исследование с использованием альфа-сателлитных ДНК-зондов на центромерные районы хромосом 18, X и Y (D18Z1, DXZ1 и DYZ3), в результате которого установлено, что дериватная хромосома является псевдодиплоидной, т.к. в ней присутствует одна активная центромера хромосомы 18, а на границе Y и X участков хромосом – неактивная центромера хромосомы Y, локализованная на обеих ее хроматидах (рис. 68).

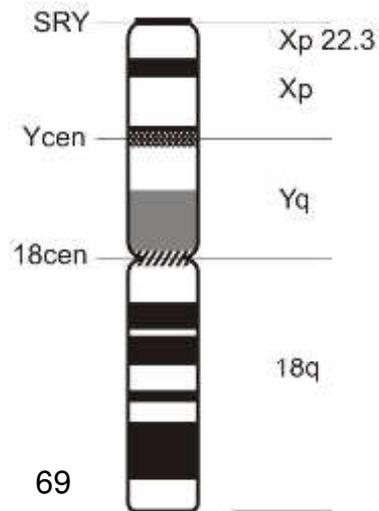
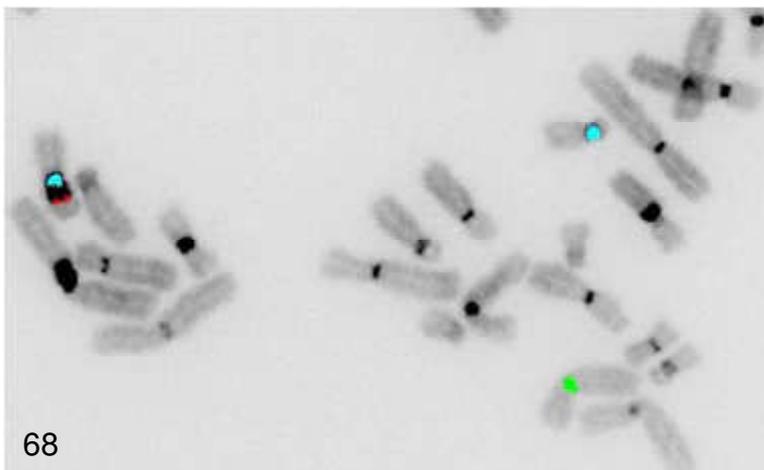


Рис. 68. Результат гибридизации с CEP18, CEPX, CEPY ДНК-зондами (инвертированная DAPI -окраска) у пациента М.Д. (SRY206).

Рис. 69. Схематическое изображение дериватной хромосомы 18 у пациента М.Д. (SRY206).

Молекулярно-цитогенетическое исследование позволило установить, что маркерная хромосома является псевдодидцентрической и содержит материал длинного плеча и центромерного района хромосомы 18, а также фрагмент дистальной части короткого плеча хромосомы X и практически всей хромосомы Y с неактивной центромерой в определенной последовательности (рис. 69).

Обнаруженная у пациента у пациента М.Д. (SRY206) хромосомная перестройка характеризуется моносомией по короткому плечу хромосомы 18 и частичной дисомией по короткому плечу хромосомы X. Согласно современной международной цитогенетической номенклатуре (ISCN) кариотип пациента:

45,X,t(Y;18)(p11.1;p11.1).ish psu dic(18;Y)t(Y;X;18)(q12;p?:p11.1)
(WCP18+,D18Z1+,WCPY+,DYZ3+,WCPX+,SRY+)dn.

Молекулярно-генетический анализ подтвердил наличие всех из исследованных локусов гоносом, за исключением маркера sY1192, локализованного в длинном плече Y-хромосомы (AZFc регион, локус Yq11.23). Происхождение данной частичной делеции (b2/b3) (*de novo* или унаследованная) не было установлено из-за недоступности ДНК отца для проведения анализа. Наличие локуса *SRY* и остальных проанализированных маркеров MSY региона, свидетельствовало о присутствии в кариотипе ребенка большей части

эухроматинового участка короткого и длинного плеча Y-хромосомы, что и обусловило развитие половых органов по мужскому типу. Несмотря на это, по-видимому, репродуктивная функция у данного пациента будет нарушена, так как наличие данной хромосомной аберрации приведет к нарушению мейоза в мужских половых клетках. Кроме того, наличие в длинном плече Y-хромосомы частичной делеции региона AZFc может быть дополнительным фактором риска нарушения сперматогенеза и бесплодия. Учитывая факт возникновения хромосомной перестройки *de novo*, можно предположить, что она явилась следствием мейотической рекомбинации в сперматогенезе отца.

Основные фенотипические признаки у ребенка обусловлены полной делецией короткого плеча хромосомы 18. Синдром делеции короткого плеча хромосомы 18, del(18p) является хорошо известен в клинической практике. Впервые он описан de Grouchy в 1963 году и характерными вариабельными фенотипическими признаками являются: задержка роста, различная степень задержки психо-речевого развития, микроцефалия, птоз, эпикант, гипертелоризм, широкие вывернутые ноздри, «рот карпа», микрогнатия, большие низкопосаженные уши. В 85% случаев делеции 18p возникают *de novo*, реже – наследуются от матерей, имеющих такую же делецию [Schaub et al., 2002]. Задержка умственного развития у данного пациента обусловлена тем, что при делеции точка разрыва на хромосоме 18 локализована в критическом районе (локус 18p11.1). Одним из основных признаков синдрома моносомии 18p является низкий рост, что обусловлено дефицитом гормона роста. Делеции локуса 18p11.3 приводят к потере гомозиготности по гену *TGIF* (*transforming growth induced factor*), локализованному в нем, что и обуславливает задержку роста при делеции дистальной части 18p.

В результате цитогенетического и молекулярно комплексного использования методов обнаружена и идентифицирована сложная транслокация с вовлечением хромосом 18 и Y, а также части короткого плеча хромосомы X, что не было выявлено при стандартном цитогенетическом исследовании. Данный пример иллюстрирует этапы расшифровки необычной перестроенной хромосомы у ребенка с задержкой роста и психомоторного развития. Уникальная дериватная хромосома, обнаруженная первоначально с помощью GTG-метода на препаратах

культуры лимфоцитов периферической крови ребенка, была изначально интерпретирована как результат несбалансированной транслокации t(Y;18). За исключением описанного выше пациента, у обследованных нами мужчин с аутосомно-гоносомными транслокациями не обнаружено потери хромосомного материала, т.е. выявленные перестройки являлись сбалансированными и не сопровождались пороками развития, низким ростом или умственной отсталостью.

Таким образом, в группе мужчин, являющихся носителями X-аутосомных или Y-аутосомных транслокаций, наличие 'классических' (полных) AZF микроделеций не обнаружено. Хотя у одного пациента обнаружено отсутствие длинного плеча Y-хромосомы, оно обусловлено потерей материала большей части материала MSY региона (всего длинного и части короткого плеча Y), в том числе регионов AZFa,b,c из-за транслокации фрагмента короткого плеча Yp на хромосому 22. При этом точка разрыва Y-хромосомы была локализована в коротком плече (локус Yp11.2). В остальных случаях полных или 'классических' делеций локуса AZF не обнаружено. Частичные микроделеции региона AZF – 'del b2/b3', детектированы у 2 из остальных 13 (15,4%) пациентов данной группы: пациента со сложной гоносомно-аутосомной перестройкой с вовлечением хромосом 18, X и Y, имевшего МВПП и одного из трех мужчин с бесплодием, имеющих X-аутосомную транслокацию.

У 11 из 12 (92%) спермиологически обследованных мужчин с аутосомно-гоносомными транслокациями обнаружено выраженное нарушение сперматогенеза (азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени), что вероятно обусловлено негативным действием наличия самой транслокации на процесс мейотического деления мужских половых клеток. Другие исследователи отмечают, что большинство мужчин-носителей аутосомно-гоносомных транслокаций страдают бесплодием [Mattei et al., 1982; Ma et al., 2003]. Единичные исследования сегрегации хромосом у мужчин с X-аутосомными транслокациями и немногочисленные – с Y-аутосомными транслокациями свидетельствуют о различии у них в частоте несбалансированных сперматозоидов по материалу хромосом, вовлеченным в перестройку [Giltay J.C. et al., 1999; Alves C. et al., 2002; Buonadonna A.L. et al., 2002; Pinho M.J. et al., 2005; Perrin A. et al., 2008; 2009]. В редких случаях X-аутосомных транслокаций описано наступление беременности и рождение здоровых детей после проведения ICSI и

крайне редко – естественным путем после длительного бесплодия [Ma et al., 2003]. Случаи сохранения фертильности у мужчин с Y-аутосомными транслокациями редки [Vialard F. et al., 2009]. У единственного пациента данной группы, у которого в кариотипе присутствовала транслокация гетерохроматина дистальной части длинного плеча Y-хромосомы (локус Yq12) на короткое плечо акроцентрической хромосомы (14p), диагностировали нормозооспермию, т.е. сперматогенез не был нарушен. Очевидно, что данный тип Y-аутосомных транслокаций является наиболее благоприятным для протекания сперматогенеза и транслоцированный дистальный гетерохроматин длинного плеча Y-хромосомы не приводит к нарушению первому и второму делений мейоза.

3.16. Молекулярный анализ Y-хромосомы у мужчин-носителей сбалансированных аутосомных перестроек с нарушением репродуктивной функции.

Сбалансированные перестройки аутосом, как правило, характеризуются отсутствием пороков развития и умственной отсталости. У их носителей репродуктивная функция может быть, как сохраненной, так и нарушенной, при этом чаще отмечают бесплодие или невынашивание в браке. У мужчин-носителей сбалансированных перестроек аутосом степень нарушения/сохранения репродуктивной функции может быть различна. В значительной мере степень сохранности репродуктивной функции при этом зависит от наличия и выраженности нарушений сперматогенеза, формы патозооспермии, частоты анеуплоидии, зрелости хроматина и целостности ДНК сперматозоидов. Наличие сбалансированной структурной перестройки может влиять на поведение хромосом в процессе делений мейоза, препятствовать прохождению его стадий, приводить к увеличению количества анеуплоидных и несбалансированных гамет. В определенной мере это определяют тип хромосомной перестройки и хромосомы, вовлеченные в перестройку, а также расположение точек разрыва. Однако у мужчин, имеющих одинаковые перестройки аутосом, например, такую распространенную хромосомную мутацию как Робертсоновская транслокация 13;14, степень нарушения репродуктивной функции и сперматогенеза значительно варьируют – от мягких форм патозооспермии, олигозооспермии различной степени

тяжести вплоть до секреторной азооспермии. Очевидно, что негативное влияние у этих пациентов может быть связано и с другими генетическими и/или средовыми факторами.

С целью молекулярно-генетического анализа Y-хромосомы среди обследованных нами мужчин с нарушением репродуктивной функции нами была отобрана отдельная группа из состоящая 38 мужчин, имеющих сбалансированные перестройки аутосом. Пациенты этой группы обратились для медико-генетического обследования по поводу первичного или вторичного бесплодия в браке, невынашиванием беременности у жен, либо с наличия у плода или детей врожденных пороков развития и/или аномалий кариотипа (табл. 44).

Молекулярный анализ Y-хромосомы выполнен у 38 мужчин, имеющих структурные перестройки аутосом: сбалансированные реципрокные транслокации аутосом (n=16), Робертсоновские транслокации (n=18) и парацентрические инверсии аутосом (n=3), кольцевую хромосому 22 (n=1). Данные обследования пациентов данной группы приведены в таблице 45.

Среди обследованных данной группы 3 пациента дополнительно имели аномалии гоносом: синдром Клайнфельтера – пациент AZF1851 с кариотипом 47,XXY,t(3;8)(q23;p21), синдром ‘46,XX-мужчина’/46,XX-тестикулярная форма НФП – пациент AZF998/SRY234 с кариотипом 45,XX,der(13;14)(q10;q10) и дисомию по хромосоме Y – пациент PR с кариотипом 47,XYY,der(13;14)(q10;q10) (табл. 44). Эти пациенты описаны в соответствующих группах, их не оценивали в данной группе вместе с остальными пациентами. В данных случаях сбалансированные хромосомные мутации являлись независимыми от мутаций половых хромосом, при этом гоносомные аномалии являлись причиной описанных выше синдромов, и были для них определяющими, при этом у первых двух пациентов, имевших секреторную азооспермию, аномалии гоносом – более ‘тяжелые’ генетические мутации, определяющие фенотип и клиническую картину, а перестройки аутосом, лишь являлись сопутствующими генетическими нарушениями. Остальные 35 носителей сбалансированных перестроек аутосом являлись взрослыми фенотипически нормальными мужчинами в возрасте от 20 до 45 лет, не имеющих аномалий формирования пола и полового развития.

Результаты анализа микроделений Y-хромосомы у мужчин с бесплодием, имеющих сбалансированные аутосомные перестройки (аутосомные транслокации или инверсии) или сбалансированные X-аутосомные транслокации.

№	Код пациента	Возраст, лет	Диагноз	Карิโอтип	Наличие делеции AZF
1	AZF2867	35	Б1	46,XY,inv(7)(p11.2;q21.12)	del b2/b3
2	AZF5167	40	Б1, астенотератозооспермия	46,XY,inv(7)(p11.2;q21)	-
3	AZF1212	31	Б1, ОАТ II	46,XY,inv(18)(p11.23;q21.1)	-
4	AZF6389	30	Б1, азооспермия	46,XY,t(22)(p11;q13)	-
5	AZF3625	26	Б1	46,XY,t(1;2)(q25;q37.1)	-
6	AZF1390	30	Б1	46,XY,t(1;4)(p21;p16)	-
7	AZF5519	44	Б1, ОАТ III (3,3 млн/мл)	46,XY,t(1;4)(p22;p35)	-
8	AZF3757	35	Б1, ОАТ III, невынашивание беременности в анамнезе	46,XY,t(1;15)(p13;q23)	-
9	AZF6763	44	Б1, ОАТ III	46,XY,t(2;21)(q11.2;p11.2)	-
10	AZF3271	38	Б1	46,XY,t(3;9)(q13.1;p21)	-
11	Б7294	42	Невынашивание беременности	46,XY,t(3;21)(p21;p11.2)	del b2/b3
12	AZF2074	36	МВПР и насбалансированная перестройка хромосомы 5 у ребенка	46,XY,t(5;6)(p?:p?)	-
13	AZF3753	36	Б1, азооспермия	46,XY,t(8;16)(p23;p13.1)	-
14	AZF597	32	Б1	46,XY,t(9;13)(p12;p12)	-
15	AZF3527	31	Б1, ОАТ III (1 млн/мл)	46,XY,t(9;15)(q21.1;p13)	del b2/b3
16	Б5195	Взрослый	Б1	46,XY,t(10;15)(q26;q22)	-
17	Б2210	33	Б1	46,XY,t(13;19)(q33.3;p12)	-
18	AZF4714	33	Б1, азооспермия-ОАТ III, варикоцеле	46,XY,t(13;19)(q12;q12)	-
19	AZF1851	32	Синдром Клайнфельтера, Б1, азооспермия	47,XXY,t(3;8)(q23;p21)	-
20	AZF3479	20	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	del b1/b3
21	AZF1237	30	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
22	AZF1309	30	Б1, астенотератозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	del b2/b3
23	Б7296	30	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
24	AZF452	45	Б1	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
25	AZF1769	40	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	del b2/b3

№	Код пациента	Возраст, лет	Диагноз	Карิโอтип	Наличие делеции AZF
27	AZF4106	30	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	del b2/b3
28	AZF4248	30	Б1, азооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
29	Л39322	35	Б1	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
30	AZF6129	30	Б1	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
31	Cv89	30	Б1, азооспермия/криптозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
32	AZF5891	30	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
33	AZF3309	33	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-
34	AZF355	28	Б1, азооспермия	45,XY,der(13;15)(q10;q10)	-
35	AZF4943	31	Б1, олигоастенозооспермия	45,XY,der(13;15)(q10;q10)	del b2/b4 (AZFc)
36	К.И.	33	Б1	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	-
37	PR	42	Дисомия Y	47,XY,Y,der(13;14)(q10;q10)	-
38	AZF998/ SRY234	26	синдром де ля Шаппеля/синдром XX-мужчина, Б1, азооспермия	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	отсутствие Yq (AZFa, b, c)

Из них 30 пациентов обратились для медико-генетического обследования и консультирования по поводу первичного бесплодия (Б1), 2 пациента – вторичного бесплодия (Б2) или невынашивания беременности, 1 мужчина – наличия МВПР и несбалансированной перестройки хромосомы 5 у ребенка (AZF2074). В анамнезе у одного обследованных мужчин данной группы (код пациента 35574) успешное выполнение программы ЭКО/ICSI (2006г.), приведшей к беременности, которая завершилась родами на сроке 7 месяцев. Родилась двойня: мальчик – умер на 2-ой день жизни (цитогенетическое обследование не выполняли), девочка – внешне здорова, как было установлено, унаследовала от отца Робертсоновскую транслокацию – кариотип 45,XX,der(13;14)(q10;q10)pat.

Результаты молекулярно-генетического исследования свидетельствовали, что все обследованные пациенты данной группы являлись SRY-позитивными. Трех пациентов с гоносомными перестройками не учитывали при расчете частоты микроделений Y-хромосомы. У пациента с синдромом Клайнфельтера, а также у мужчины с Робертсоновской транслокацией и дисомией Y микроделений не было обнаружено; а у пациента с синдромом 46,XX-мужчина установлено отсутствие последовательностей длинного плеча Y-хромосомы ('делеция' всех маркеров локуса AZF) вследствие потери большей части Y-хромосомы в результате транслокации материала Yp11 на короткое плечо хромосомы X (локус Xp22.3).

Микроделеции Y-хромосомы обнаружены у 8 из 34 (22,9%) мужчин с нарушением репродуктивной функции, имеющих аутомсомные перестройки без аномалий гоносом: у 1 из 3 пациентов, имеющих перичентрическую инверсию хромосомы 7 (делеция 'b2/b3'), у 2 из 13 (15,4%) носителей реципрокных транслокаций (делеция 'b2/b3') и у 5 из 16 (31,3%) носителей Робертсоновских транслокаций (делеция 'b2/b3', n=3; 'b1/b3', n=1; 'b2/b4' или полная AZFc делеция, n=1) (табл. 44).

Наиболее распространенной Робертсоновской транслокацией и самой частой из сбалансированных аутомсомных перестроек в данной группе пациентов являлась транслокация Rob (13;14). Данная хромосомная мутация, обнаруженная у 14 пациентов, имеющих в кариотипе только сбалансированные аутомсомные перестройки, а также у 2 из трех пациентов, имеющих одновременно аутомсомные и гоносомные мутации, ее доля среди Робертсоновских транслокаций в данной

группе составила 84,2% и 42,1% от всех исследованных сбалансированных аутосомных транслокаций.

Среди обследованных мужчин со сбалансированными аутосомными перестройками, у которых были обнаружены микроделеции Y-хромосомы: у пациента, имеющего полуую AZFc (b2/b4) делецию, а также у мужчины с делецией b1/b3 при спермиологическом исследовании выявлена тяжелая форма олигозооспермии, что свидетельствовало о выраженном нарушении сперматогенеза. Среди пациентов-носителей делеции b2/b3, у которых нами было проведено спермиологическое обследование, выявлена олигозооспермия II-III степени, и у одного пациента – астенотератозооспермию. У пациента с кольцевой хромосомой 22 (AZF6389) не обнаружено микроделений Y-хромосомы. По данным стандартного спермиологического исследования, проведенного неоднократного, у него диагностирована секретронная азооспермия. Вероятно, что нарушение сперматогенеза в данном случае обусловлено наличием в кариотипе кольцевой хромосомы 22.

Таким образом, в группе мужчин с нарушением репродуктивной функции, имеющих сбалансированные аутосомные перестройки, микроделеции длинного плеча Y-хромосомы выявлены у 21,1% пациентов. Все обнаруженные микроделеции располагались в регионе AZFc (локус Yq11.23). Большинство (7 из 8) были представлены частичными делециями региона AZFc: del b2/b3 (n=6), del b1/b3 (n=1), и только одна – полной делецией AZFc (del b2/b4). В 3 из 38 случаев (7,9%) отмечено наличие сбалансированной перестройки аутосом (Робертсоновской или реципрокной транслокации) у пациентов с аномалиями половых хромосом (дисомии Y, синдрома Клайнфельтера, синдрома 46,XX-мужчина).

3.17. Исследование частоты и спектра структурных аномалий Y-хромосомы у мужчин с бесплодием.

С целью исследования частоты и спектра делеционных нарушений в локусе AZF выполнен молекулярный анализ Y-хромосомы на крупной выборке из **8239** мужчин с нарушением репродуктивной функции. Следует отметить, что детальная характеристика данной группы пациентов не может быть детальной в связи со столь крупным ее размером, а также отсутствием сведений о многих из обследованных. Все пациенты были мужчинами репродуктивного возраста, за редким исключением не являлись родственниками. Причиной для проведения данного молекулярно-генетического обследования являлось первичное или вторичное бесплодие в браке и/или различные формы патозооспермии, преимущественно азооспермия и олиго(астено/терато)зооспермия. Некоторые из мужчин данной группы описаны в отдельных подгруппах пациентов, имеющих различные хромосомные аномалии и/или нарушения репродукции (например, мужчины с анеуплоидией и/или структурными перестройками Y-хромосомы, со сбалансированными перестройками аутосом, со гоносомно-аутосомными-транслокациями, пациенты с X/Y мозаицизмом, с синдромами Клайнфельтера, 46,XX-мужчина, тестикулярной дисгенезии). У 8239 мужчин выполнено исследование на наличие полных ('классических') AZF делеций, а у 6559 мужчин - как полных, так и частичных AZF делеций.

В целом делеции длинного плеча Y-хромосомы в интервале Yq11.21-Yq11.23 обнаружены у 1382 (16,77%) пациентов данной группы. Различные типы полных AZF делеций детектированы у 4,93% мужчин с бесплодием (табл. 45, рис. 70-72). Наиболее частым типом из них являлась делеция AZFc (b2/b4), обнаруженная у 3,59% мужчин с бесплодием (табл. 45, рис. 71). Второе по частоте место занимали делеции, делеции AZFb+c (одновременно затрагивающие два региона AZFb и AZFc), выявленные у 0,52% мужчин. Делеции региона AZFb детектированы у 0,27% пациентов. Наиболее редкие делеции – del AZFa выявлены у 0,22% мужчин. У трех из их носителей (что составило 1/6) отмечено сочетание полной делеции AZFa и частичной делеции региона AZFc (делеции b2/b3), а в одном – частичной делеции региона AZFa (локусов sY84, sY615). Среди обследованных пациентов нами не обнаружено таких делеций, как делеции AZFa+b (табл. 45).

Таблица 45.

Типы делеции локуса AZF и их частота у мужчин с бесплодием (n=8239).

Тип делеций	Количество обследованных пациентов	Количество пациентов с обнаруженными делециями	Частота
‘Классические’ (полные) делеции AZF-локуса	8239	406	4,93%
AZFa*		18	0,22%
AZFb		22	0,27%
AZFc (полные)		296	3,59%
AZFa+b (полные)		-	-
AZFb+c		43	0,52%
AZFa+c (полные)		-	-
AZFa+b+c		27	0,33%
‘Частичные’ AZF-делеции	6645	979	14,73%
частичные AZFa		1	0,015%
частичные AZFb		8	0,12%
частичные AZFc:		970	14,59%
b2/b3		719	10,82%
gr/gr	217	3,27%	
другие	34	0,51%	

Примечание: * - в 3 из 18 делеции AZFa сочетались с частичной AZFc делецией.

Делеции, захватывающие всех трех регионов (del AZFa+b+c) обнаружены у 27 (0,34%) мужчин. У 2 пациентов данные делеции захватывали только дистальную часть региона AZFa и целиком регионы AZFb и AZFc. Отсутствие всех исследованных последовательностей длинного плеча Y-хромосомы – делеция всего локуса AZF установлено у 25 SRY-позитивных пациентов мужского пола. Следует отметить, что во всех случаях делеция ‘AZFa+b+c’ выявленная потеря значительной части эухроматина MSY была обусловлена наличие цитогенетической ‘макроструктурной’ перестройкой Y-хромосомы: протяженной терминальной Yq делеции, изохромосомы isoYp, изодигетической хромосомы (idicYp) или транслокации или инсерции материала Yp с сохранением локуса SRY (например, синдром 46,XX-мужчина).

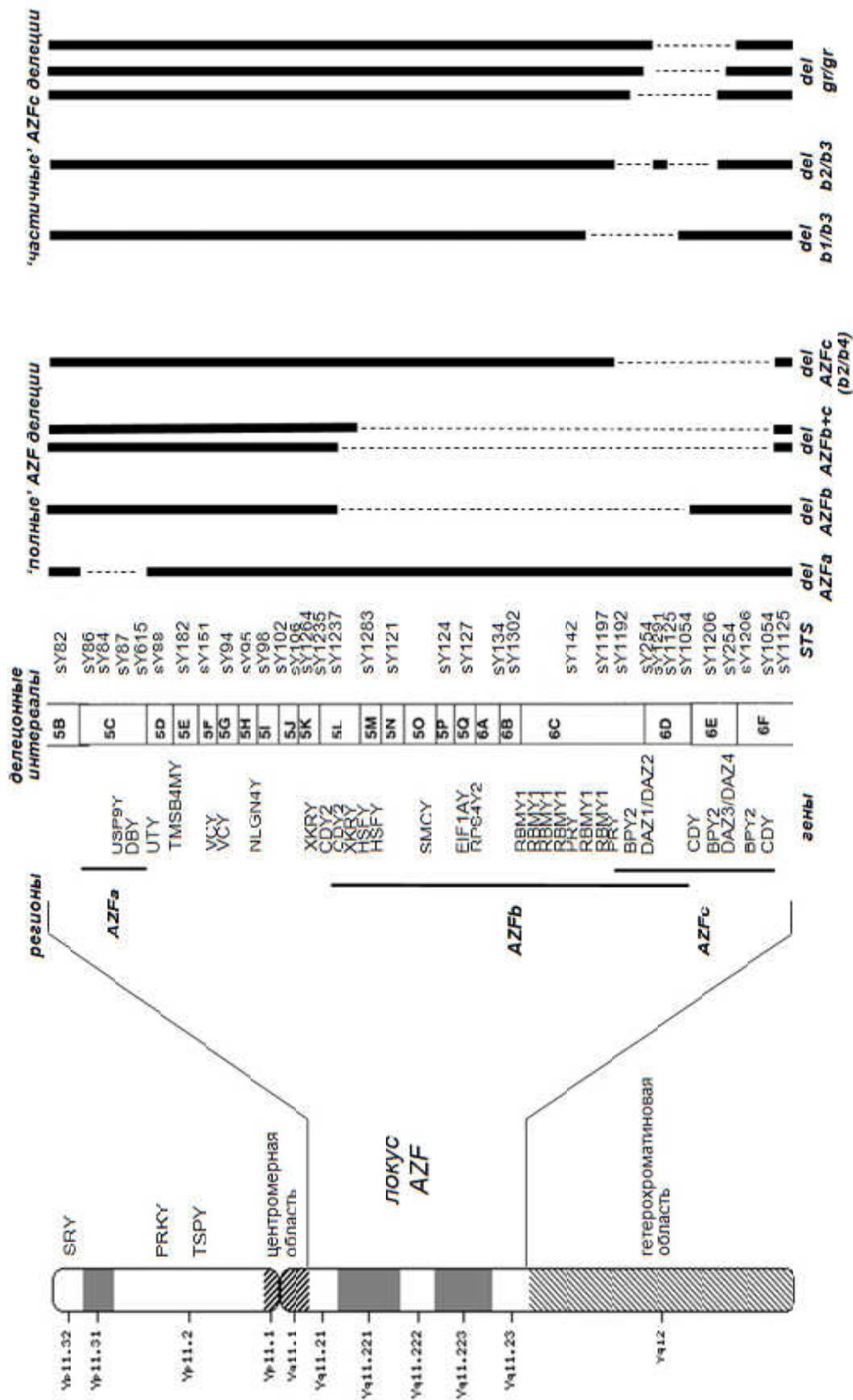


Рис. 70. Карта Y-хромосомы человека с указанием ее локусов и некоторых генов (слева). Примечание: На выноске справа детально показан AZF локус (регион) и его (суб)регионы, гены, делеционные интервалы (5B-6F), STS-маркеры, а также наиболее частые типы 'полных' AZF делеций и частичных делеций AZFc региона.

Таким образом, делецию 'AZFa+b+c' не следует рассматривать как тип микроструктурной перестройки. Также и значительная часть делеций AZFb+c и некоторые полные AZFc делеции, как нами установлено с помощью цитогенетического исследования и результатам картирования точек разрыва, также являются результатом цитогенетически идентифицируемых перестроек Y-хромосомы с потерей терминальной части ее длинного плеча: гетерохроматинового региона Yq12 и дистальной части эухроматина Yq11.2. Так половина всех делеций AZFb+c являлась следствием насбалансированной перестройки Y-хромосомы с потерей дистальной части длинного плеча (терминальных леци или дицентриков).

Наличие частичных AZF делеции у 14,73% мужчин с бесплодием. За редким исключением почти все частичные делеции располагались в AZFc регионе или ее проксимальной границе (область перекрывания регионов AZFb и AZFc). Наиболее частыми их типами являлись делеции b2/b3 – 10,82%, gr/gr – 3,27% (табл. 45, рис.73). Другие - редкие типы частичных AZF делеций выявлены в 34 (0,51%) случаях. Карта STS маркеров, карта ампликонов и генов с полными и частичными делециями данного региона Y-хромосомы приведены на рисунках 5 и 6 Приложения 12 и 14, соответственно. Характеристика генов и различных типов делеций AZFc приведены в таблицах 7 и 8 Приложения 11, 13, соответственно,

Результаты анализ результатов исследования мутаций Y-хромосомы с помощью цитогенетического и молекулярно-генетического исследование позволили определить структуру цитогенетических аномалий и микроструктурных перестроек Y-хромосомы у мужчин с бесплодием (рис. 71). Числовые и структурные мутации в целом составили 20,2%. Среди них значительно более, чем в 30 раз преобладали микроструктурные перестройки длинного плеча Y-хромосомы. Как в структуре полных AZF делеций, так и частичных AZF делеций преобладают делеции региона AZFc. В данном регионе Y-хромосомы располагается самый протяженный палиндром, состоящий из множества ампликонов, имеющих прямую или обратную ориентацию [Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Repping et al., 2002; Skaletsky et al., 2003] и характеризующийся высокой частотой Y-Y рекомбинации, приводящей к микроделециям/микродупликациям, микроинверсиям, генной конверсии [Rozen et al., 2003; Repping et al., 2006].



Рис. 71. Частота цитогенетических аномалий и микроструктурных перестроек Y-хромосомы у мужчин с бесплодием.

Частичные делеции в области региона AZFc и его проксимальной границы (локус Yq11.23) располагаются в 3 палиндромах P1, P2 и P3 (рис. 70). Регионы AZFb и AZFc частично перекрываются (дистальная часть региона AZFb и проксимальная часть региона AZFc). Ранее при обнаружении делеции в данной области Y-хромосомы побудило авторов предположить наличие еще одного региона AZF региона, названного «AZFd» [Kent-First et al., 1999]. Однако в дальнейшем большинством исследователей было принято не выделять отдельно четвертый AZF-регион, а относить маркеры и делеции, располагающиеся в данной области к либо к региону AZFc, либо к региону AZFb. Недавно, некоторые из делеций данной области по названию располагающегося в ней палиндрома P3 называют делециями P3, при этом выделены несколько их подтипов, P3a-d, наличие которых у мужчин может связано с изменением количества сперматозоидов [Noordam et al., 2011].

В обследованной нами группе мужчин из неотобранных мужчин из российской популяции микроделеции обнаружены у 9 из 100 (9%) человек. Все из обнаруженных микроделеций являлись частичными делециями региона AZFc, среди них наиболее частой являлась делеция b2/b3, выявленная у 4 (7,7%) мужчин контрольной группы. Кроме того, нами была исследована 200 российских мужчин, имеющих гаплогрупп N, для которой характерна данная микроделеция Y-

хромсомы [Repping et al., 2004]. За исключением одного образца, мы обнаружили у всех носителей N-гаплогруппы делецию b2/b3 (данные не показаны). Полученные данные подтверждают, что данная частичная делеция представляет собой микроделеционный полиморфизм Y, характерный для гаплогруппы N.

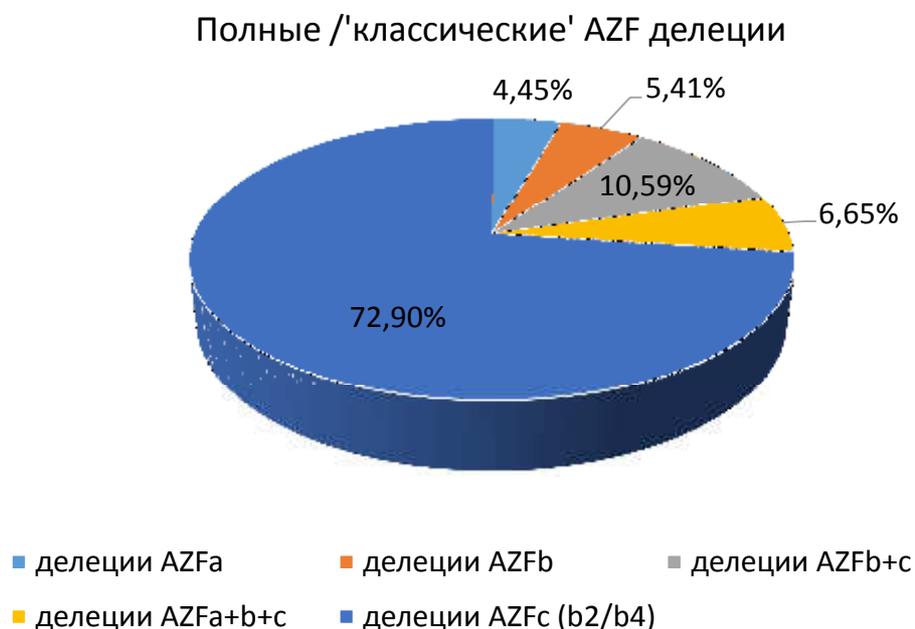


Рис. 72. Спектр делеционных нарушений длинного плеча (локуса AZF) Y-хромосомы у мужчин с нарушением репродуктивной функции.

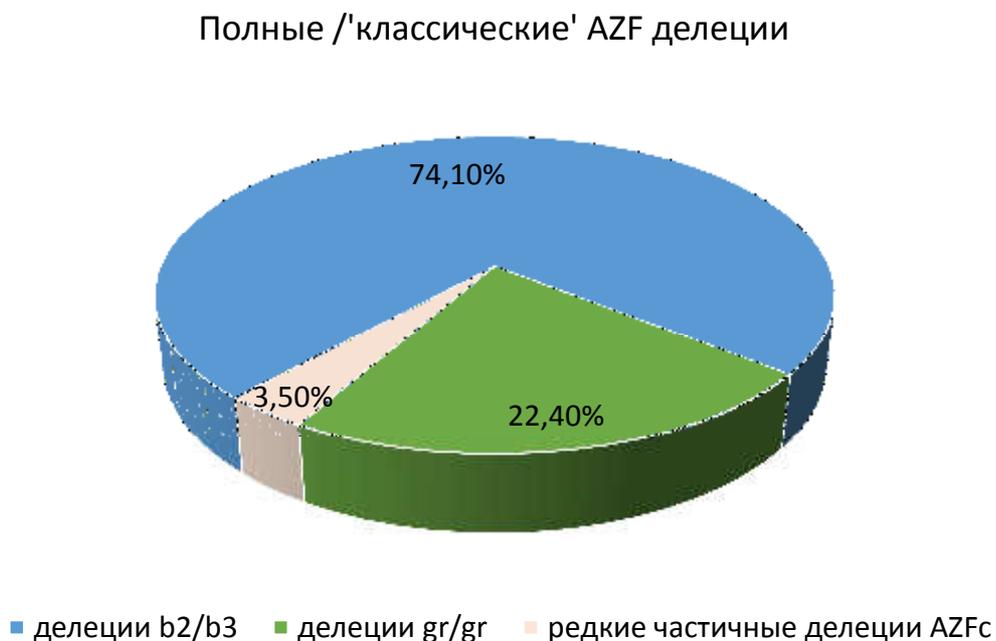


Рис. 73. Структура частичных делеций региона AZFc Y-хромосомы у мужчин с нарушением репродуктивной функции.

Из 18 обнаруженных делеций AZFa, в 16 случаях делеция целиком захватывала данный регион, и только в одном частично удаляла его большую часть с обоими генами региона *USP9Y* и *DBY* (пациент AZF5658). У трех мужчин (AZF1749, AZF2789 и AZF6386) помимо полной делеции AZFa выявлено наличие частичной делеции региона AZFc – b2/b3, являющейся наиболее частой из всех обнаруженных нами микроделеций Y-хромосомы у российских мужчин. Насколько нам известно, в научной литературе не описаны исследования частичных делеций региона AZFc (таких, как делеции b2/b3, b1/b3, gr/gr) у мужчин с делециями региона AZFa. Хотя в научной литературе встречаются статьи, в которых описаны случаи “множественных” делеций в локусе AZF Y-хромосомы, по-видимому, большинство из них представляет собой ложноположительные делеции, вследствие ошибок ПЦР-анализа или интерпретации его результатов. Особенно подозрительны работы, в которых сообщаются перемежающиеся «выпадения» локусов в одних и тех же участках Y-хромосомы, повторяющиеся у различных пациентов. Реальная мозаичность выпадения различных участков хромосомы (что характерно для хромотрипсиса), в нашем случае длинного плеча Y-хромосомы практически не встречалась нами у мужчин с нормальным кариотипом. В редких случаях у пациентов с мозаицизмом по структурно-перестроенной Y-хромосоме мы наблюдали нестабильность повторения результатов амплификации с одними и теми же праймерами, что связано с самим гоносомным, в том числе возможным динамическим мозаицизмом с наличием клонов с различным количеством и целостностью хромосомы Y. Обнаруженная у мужчин с бесплодием, имеющих делеции AZFa, частота делеции b2/b3 (3 из 18, т.е. 1/6), превышает частоту делеции b2/b3 в обследованной нами общей выборке мужчин с бесплодием примерно в 1,5 раза. Хотя при таком малом размере выборке не позволяет судить об наличии или отсутствии ассоциации данных микроделеций Y-хромосомы.

С целью исследования происхождения (*de novo* или унаследованные) количественных и структурных перестроек Y-хромосомы, как идентифицируемых с помощью цитогенетического анализа, так и микроделеций Yq11.2, нами обследована группа из 16 отцов 18 пациентов с различными Y-позитивными мутациями половых хромосом, имеющих различные формы формирования пола (СШТ, синдром Клайнфельтера, СДГ, тестикулярный дисгенез, гипоспадию и др.)

(Приложение 16 таб. 10). Пациентов родились от беременностей, наступивших естественным путем за исключением одного пациента мужского пола с мозаицизмом 45,X/46,XY, имевшего полную AZF делецию. В данном случае, беременность наступила в результате процедуры ЭКО/ICSI. Выполненной у супружеской пары в связи с «мужским фактором» бесплодия. У отца пробанда была диагностирована тяжелая форма олигозооспермии, однако перед проведением программы ЭКО, медико-генетическое обследование супружеской пары не было проведено. При рождении у пробанда было отмечено неправильное строение наружных половых органов с наличием гипоспадии и крипторхизма. В связи с этим семья обратилась для медико-генетического обследования. В остальных случаях причинами обращения являлось нарушения формирования пола или гипогонадизм, в одном случае – наличие множественных пороков развития.

За исключением одного отца, имевшего перичентрическую инверсию хромосомы Y, родители, которым выполнено цитогенетического обследование, имели нормальный кариотип. Анализ микроделеций Y-хромосомы выполнен у 13 отцов. В одном случае (пациентка с СШТ и кариотипом 45,X/46,XY) по данным молекулярно-генетического исследования выявлено отсутствие всех исследованных последовательностей короткого и длинного плеч Y-хромосом, что свидетельствовало об ошибке цитогенетического исследования. Еще в одном случае X/XY мозаицизма у новорожденной девочки с двойственным развитием гениталий при молекулярно-цитогенетическом исследовании установлено, что Y-хромосома является дицентриком $idicYp$, а при молекулярно-генетическом анализе выявлена редкая частичная делеция AZFc региона ($del sY1206$). У ее отца ее наличие не было обнаружено, поэтому для проверки выполнен ДНК-анализ на их биологическое родство, результаты которого свидетельствовали об его отсутствии. Из остальных 11 в 7 случаях выявлено наличие полной ($n=1$) или частичных AZFc ($b2/b3$, $n=5$ gr/gr, $n=1$) делеций. В 6 из них делеции были переданы без увеличения размера AZF делеции и в одном случае у отца-носителя, имевшего делецию $b2/b3$, у ребенка возникла протяженная микроделеция длинного плеча Y-хромосомы, захватывающая регионы AZFb и AZFc. Очевидно, подобное увеличение размеров делеций на Y-хромосоме в ходе мейотической рекомбинации

у мужчин-носителей AZF делеций с сохраненным сперматогенезом происходит редко, однако точная частота этих событий практически не изучено.

Из трех исследованных случаев полисомии по половым хромосомам (48,XXXУ; 48,XXУУ и мозаичной тетрасомии У), как установлено с помощью молекулярно-генетического исследования, в первом (48,XXXУ), причиной числовой аномалии гоносом являлось презиготическое нерасхождение хромосом Х в оогенезе у матери, во втором (48,XXУУ) – сочетание нерасхождения половых хромосом у обоих родителей, а в третьем – наиболее вероятно, презиготическое нерасхождение У-У в сперматогенезе у отца и последующих постзиготических нерасхождений хромосом У, приведших к сложному мозаицизму по хромосоме У (см. табл. Приложения).

Таким образом, по данным комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического исследования в структуре мутаций У-хромосомы преобладают делеции длинного плеча У-хромосомы. Цитогенетические структурные перестройки и количественные мутации У-хромосомы выявлены у 0,4% и 0,2% мужчин с бесплодием, соответственно. Микроделеции Yq обнаружены у 16,77% пациентов. Большинство обнаруженных микроделеций У-хромосомы располагалось в дистальной части MSY региона – в области палиндромов P1-P3, в локусе Yq11.23. При этом полные AZF делеции выявлены у 4,93% мужчин. Среди них наиболее частым типом являлась делеция AZFc (b2/b4), обнаруженная у 3,59% мужчин с бесплодием. Второе по частоте место заняли делеции AZFb+c, выявленные у 0,52% пациентов. Делеции региона AZFb детектированы у 0,27%, а наиболее редкие делеции – del AZFa выявлены у 0,22% мужчин с бесплодием. У трех из 18 их носителей отмечено сочетание полной делеции AZFa и частичной делеции региона AZFc (делеции b2/b3), а в одном – частичной делеции региона AZFa (отсутствие дистальной области региона – локусов sY84, sY615). Частичные AZF делеции обнаружены у 14,73% мужчин. За редким исключением почти все частичные делеции располагались в AZFc регионе или ее проксимальной границе. Наиболее частыми их типами являлись делеции b2/b3 и gr/gr, составившие 74,1% и 22,4%, всех частичных делеций региона AZFc. В остальных случаях детектированы редкие частичные AZFc делеций.

3.18 Цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое обследование пациентов с перичентрическими инверсиями хромосомы Y.

Перичентрические инверсии хромосомы Y могут возникать вновь, но часто передаются от отца сыну. В большинстве случаев данные сбалансированные перестройки являются «нейтральными» вариантами, однако возможность их минорного влияния на фертильность мужчин обсуждается.

Среди обследованных нами пациентов 13 индивидуумов мужского пола, имеющих эуплоидный кариотип с наличием Y-хромосомы с перичентрической инверсией (n=10) или структурно перестроенной Y-хромосомы – der(Y), предположительно инверсии (n=3). Из них 10 пациентов являлись неродственными мужчинами, обратившимися для медико-генетического обследования по поводу бесплодия (n=8) или привычное невынашивание (n=2) в браке, остальные трое являлись родственниками: сын (пробанд), его отец и дед со стороны отца (табл. 46). Данная семья была обследована в связи с подозрением у пробанда (новорожденного мальчика) синдрома Дауна. Цитогенетическое исследование позволило выявить его регулярную форму трисомии 21, а также свидетельствовало о наличии перичентрической инверсии Y-хромосомы, которая также была обнаружена у отца и деда больного, имевших кариотип 46,X,inv(Y)(p11.2;q11.2). В научной литературе сообщали случаи трисомии 21 в сочетании с перичентрической инверсией Y [Sparkes et al., 1970; Krishna Murthy et al., 1989; Rivera et al., 2002], поэтому мы выполнили анализ происхождения дополнительной хромосомы в кариотипе пробанда. Как было установлено, она имела материнское происхождение (данные не показаны), поэтому выявленная Y-инверсия не могла быть связана с возникновением обнаруженной аутомсомной анеуплоидии.

Анализ микроделеций Y-хромосомы выполнен у 8 носителей Y-инверсий: у всех трех мужчин в семье с больным синдромом Дауна, а также у 5 пациентов с нарушением репродуктивной функции, имеющих перичентрические инверсии Y. В семейном случае инверсии Y-хромосомы у всех мужчин выявлена частичная делеция региона AZFc – делеция b2/b3, которая, очевидно, не повлияла на фертильность отца и деда.

Таблица 46.

Результаты цитогенетического и молекулярно-генетического обследования пациентов с инверсиями Y-хромосомы.

Фенотип/ диагноз	Количество пациентов, n	Карิโอтип по данным стандартного цитогенетического	Результаты молекулярно- цитогенетического (FISH анализ)	Результаты молекулярно- генетического анализа Y- хромосомы
БІ, азооспермия	1	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	Н.п.	Делеция b2/b4
БІ	1	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	Н.п.	Делеция b2/b3
БІ, астенозооспермия (n=1) олигозооспермия средней степени (n=1); н.и. (n=1)	3	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	Н.п.	Н.п.
БІ	1	46,X,der(invY?)	der(Y).ish inv(Y) (WCPY+, SRY+, WCPX-)	Н.п.
БІ	2	46,X,der(invY?)	der(Y).ish inv(Y) (WCPY+, SRY+, WCPX-)	-
Синдром Дауна	1	47,X,inv(Y)(p11.2q11.2),+21	Н.п.	Делеция b2/b3
Отец и дед больного	2	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	Н.п.	Делеция b2/b3
ПНБ, нормозооспермия	1	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	Н.п.	Н.п.
ПНБ, нормозооспермия	1	46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	Н.п.	-

Примечание: н.и. – не проводили.

У одного из 5 мужчин с бесплодием, имевшего азооспермию, выявлена полная AZFc (b2/b4) делеция, по-видимому, возникшая *de novo*.

FISH анализ, проведенный у 3 пациентов с перичентрическими инверсиями, позволил выявить природу дериватных хромосом и уточнить расположение точек разрыва: $der(Y).ish\ inv(Y)(WCPY+,SR Y+,WCPX-)$. Кариотип по результатам цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования 46,X, $inv(Y)(p11.2;q11.23)$. Точка разрыва в коротком плече располагалась в локусе Yp11.2, а в длинном – в локусе q11.23 (регион AZFc), что характерно для большинства перичентрических инверсий [Knebel et al., 2011]. Вероятно, они возникают в результате рекомбинаций между копиями повтора IR1 Y-хромосомы. Одна его копия располагается в локусе Yp11.23, а другая – в области проксимальной границы региона AZFc, где располагается маркер sY1192, утрата которого свидетельствует о наличии частичной делеции b2/b3. Вероятно, перичентрическая инверсия, обнаруженная в семье с больным ребенком, возникла на фоне данной микроделеции Y-хромосомы. Однако нельзя исключить, что обнаруженная микроделеция в локусе sY1192 могла возникнуть в результате самой перичентрической инверсии, поскольку одна из копий повтора IR1 располагается в месте его расположения в Yq11.223 [Skaletsky et al., 2003]. Отсутствие микроделений Y-хромосомы у других пациентов указывает на сохранение локусов AZFc и может свидетельствовать о возможном различии в расположении точек разрыва/расположению рекомбинирующих участков Y-хромосомы, приводящих к возникновению перичентрических инверсий.

Другие авторы свидетельствуют о разных типах перичентрических инверсий Y с точками разрыва в Yp11 и Yq11.2-q12 [Verma et al., 1997; Knebel et al., 2011]. Очевидно, что перичентрические Y-инверсии могут возникать вследствие рекомбинации между копиями повторов IR1 и IR4, картированных в локусах Yp11.2 и Yq11.23, а также между другими областями Y-хромосомы. Дифференциальная диагностика соответствующих типов перичентрических Y-инверсий затруднена близостью в расположении копий разных инвертированных повторов (0,8-1,0 млн.п.н.). Инверсии $inv(Y)$ I и II типа являются семейными и характеризуются точками разрыва в локусах Yq11.23 и Yq11.223, располагающихся вне кластера генов *DAZ* и *CDY* региона AZFc. Инверсии $inv(Y)$

III типа характеризуются точками разрыва в Yq11.223 локусе в AZFc регионе, на границе кластера генов *DAZ* и *CDY*. Этот тип инверсии встречается при семейных случаях, как у мужчин с сохранением фертильности, так и у мужчин с нарушением сперматогенеза и бесплодием. Еще одним вариантом *inv(Y)* является семейная инверсия, в результате которой Y-хромосома становится почти акроцентрической. Точки разрыва при этом располагаются в локусах *TSPY* и *RBMY* в Yp11.2 и в пределах гетерохроматина Yq12. В некоторых случаях инверсии сочетаются с другими аномалиями гоносом, в частности с Yq дециями [Röttger et al., 2000]. Поэтому, вопрос о влиянии расположения точек разрыва при различных типах Y-инверсий остается открытым.

Таким образом, перицентрические инверсии Y-хромосомы встречаются у пациентов с различным фенотипом, в том числе как фертильных мужчин, так и мужчин с нарушением репродуктивной функции, бесплодием и привычным невынашиванием в браке. Для перицентрических инверсий не характерно тяжелых нарушений сперматогенеза. Единственно выявленный среди обследованных нами мужчин с случай инверсии Y-хромосомы при азооспермии обусловлен делецией региона AZFc, а не собственно инверсией.

В редких случаях Y-инверсии сочетаются с другими аутосомными аномалиями, например, с трисомией 21, происхождение которой не связано с Y-инверсией.

Использование FISH анализа или сочетание различных генетических (молекулярных и цитогенетических) методов позволяет проводить дифференциальный анализ перицентрических инверсий Y-хромосомы от других ее структурных перестроек. Инверсии Y-хромосомы встречаются как с наличием делеций Yq, без них. Микроделеции AZFc региона (частичные, b2/b3, n=4 и полные AZFc или b2/b4, n=1) обнаружены у 5 из 8 обследованных мужчин с перицентрическими инверсиями Y-хромосомы.

3.19. Анализ микроделечий Y-хромосомы у пациентов с гетероморфизмом длинного плеча Y-хромосомы или подозрением на цитогенетические Yq делеции.

Среди обследованных нами мужчин с бесплодием, которым выполнено цитогенетическое (анализ кариотипа) и/или молекулярно-генетическое исследование (анализ микроделечий Y-хромосомы) у 34 пациентов отмечено наличие гетероморфизма/аномалий размера длинного плеча Y-хромосомы. Все пациенты являлись мужчинами в возрасте от 24 до 44 лет с бесплодием браке, не имеющими нарушений формирования пола.

Поскольку гетерохроматин Yqh (локус Yq12) находится в непосредственной близости от дистальной части эухроматина длинного плеча Y-хромосомы, где располагается регион AZFc, нами проведен анализ результатов исследования на наличие микроделечий Y-хромосомы среди пациентов с подозрением на наличие цитогенетически идентифицируемыми Yq делеций (n=7) и гетероморфизмом Yqh (n=27). Среди последних полиморфизм гетерохроматина короткий (Yqh-, Yqh min) или увеличенный по сравнению с нормальным размером (Yqh+) встречали в 21 и 6 случаях, соответственно (табл. 47).

Таблица 47

Делеции в локусе AZF у 34 мужчин с подозрением на цитогенетически идентифицируемые делеции/гетероморфизмом длинного плеча Y-хромосомы.

Кариотип, вариант Yqh	Количество, n	Микроделечии AZF не обнаружены	Микроделечии AZF	
			Полные	Частичные AZFc
46,XY,delYq?	7	3	AZFc, n=1	b2/b3, n=2; gr/gr, n=1
46,XYqh- *	21	12	AZFb+c, n=3; AZFc, n=2	b2/b3, n=4
46,XYqh+	6	3	AZFa, n=1;	b2/b3, n=1; gr/gr, n=1

Примечание: * один из пациентов имел X-аутосомную транслокацию (кариотип 46,XY,t(7;X)(q21.2;q26),Yqh-) и делецию b2/b3.

Делеции части дистальной эухроматиновой области MSY региона (в интервале Yq11.21-Yq11.23) обнаружены у 16 из 34 (47%) мужчин данной группы. Из них у 7 пациентов детектированы полные AZF делеции (AZFa, n=1, AZFb+c, n=3 и AZFc (b2/b4), n=3), а у 9 - выявлены частичные делеции региона AZFc (делеция b2/b3, n=7 и делеция gr/gr, n=2).

У всех обследованных данной группы, имеющих полные AZF делеции выявлена секреторная азооспермия либо криптозооспермией/олигозооспермия тяжелой степени с концентрацией сперматозоидов менее 1 млн/мл. У носителей частичных делеций региона AZFc отмечено выраженное варьирование в степени нарушения сперматогенеза (от азооспермии до астенозооспермии).

Примечательно, что большинство (6 из 7) полных AZF делеции детектированы у пациентов, у которых при стандартном цитогенетическом исследовании в кариотипе не обнаружено наличия делеций Yq11.2, а у 3 из 9 мужчин, у которых обнаружены частичные AZFc делеции (b2/b3, n=2 и gr/gr, n=1) предполагали наличие делеции части Yq эухроматина (Yq11.23). Во всех трех случаях делеции AZFb+c обусловлены наличием терминальных делеций длинного плеча Y-хромосомы с точками разрыва в локусах Yq11.221 (n=2) и Yq11.222 (n=1). В отличие от них делеция AZFa, а также полные AZFc (b2/b4) и частичные AZFc (b2/b3 и gr/gr) делеции представляли собой интерстициальные делеции, располагающиеся в локусах Yq11.21 и Yq11.23, соответственно. Важно отметить, что микроделеции Y-хромосомы выявлены как среди пациентов с коротким (Yqh-), так и увеличенный (Yqh+) гетерохроматиновым блоком, при этом частота обнаруженных среди них делеций AZF была сопоставимой.

Таким образом, выявлена высокая (47%) частота AZF делеций среди пациентов с гетероморфизмом/аномалий размера длинного плеча Y-хромосомы. Различные полные AZF делеции (AZFa, AZFb+c и AZFc), обнаружены у 20,6% мужчин, частичные делеции региона AZFc (b2/b3 и gr/gr) – у 26,5% пациентов данной группы. Среди мужчин с предполагаемыми интерстициальными цитогенетическими делециями Yq11.2 полные делеции (делеция AZFc) обнаружено в 1 из 7 случаев, а также отмечена частая встречаемость частичных делеция региона AZFc (3/7).

У пациентов с вариантами размера гетерохроматина помимо высокой частоты частичных AZFc делеций (22,2%), выявлено наличие полных AZF делеций (22,2%), при этом обнаружены как интерстициальные, так и терминальные Yq11.2 делеции. Последние встречали только среди пациентов с коротким (Yqh-), гетерохроматиновым блоком, имеющим делеции AZFb+c. Полученные данные свидетельствуют о необходимости внимания при проведении цитогенетического и молекулярно-генетического обследования у пациентов с гетероморфизмом и делециями длинного плеча Y-хромосомы, в том числе имеющих как укороченный, так и увеличенный блок дистального гетерохроматина.

3.20. Исследование частоты и выраженности гоносомного мозаицизма при различных гоносомных синдромах и мутациях с вовлечением Y-хромосомы или ее материала.

В случае гоносомного мозаицизма соотношение клонов, несущих различный набор половых хромосом, имеет принципиальное значение для степени дифференцировки пола, развитию органов половой системы, гаметогенеза и репродуктивной функции. Однако количество клеток, несущих различные нормальные наборы половых хромосом (46,XX и 46,XY) или нормальный и аномальный клон(ы) с анеуплоидией по гоносомам, может быть как различным, схожим или даже одинаковым у пациентов, так и с различным фенотипом (с развитием пола по женскому или мужскому типу или различная степень интерсексуальности). При этом у некоторых пациентов-мозаиков наблюдается несоответствие фенотипа выраженности преобладающего (мажорного) клона.

С целью выявления зависимости степени дифференцировки и развития половой системы при гоносомном мозаицизме и химеризме 46,XX/46,XY у 91 пациента проведен анализ кариотипов, установленных с помощью цитогенетического и/или молекулярно-цитогенетического обследования.

Нами исследована количество Y-позитивных клеток в кариотипе у 71 пациента с X/XY мозаицизмом или его вариантами, имеющим женский (n=35) или мужской фенотип (n=36). Мозаицизм у данных больных обнаружен с помощью

цитогенетического исследования и молекулярно-цитогенетического (FISH) исследования на лимфоцитах периферической крови.

Количество клеток, несущих Y-хромосому в кариотипе, в группах женщин и мужчин варьировало от 5,88% до 95% и от 16,67% и до 99,6%, соответственно. Как было установлено, исследуемые выборки двух данных групп имели нормальное (женщины-мозаики) или близкое к нормальному (мужчины-мозаики) типы распределение по изучаемому признаку (рис. 74), так как показатель среднего значения распределения в выборке совпадал или практически совпадал со значением медианы распределения.

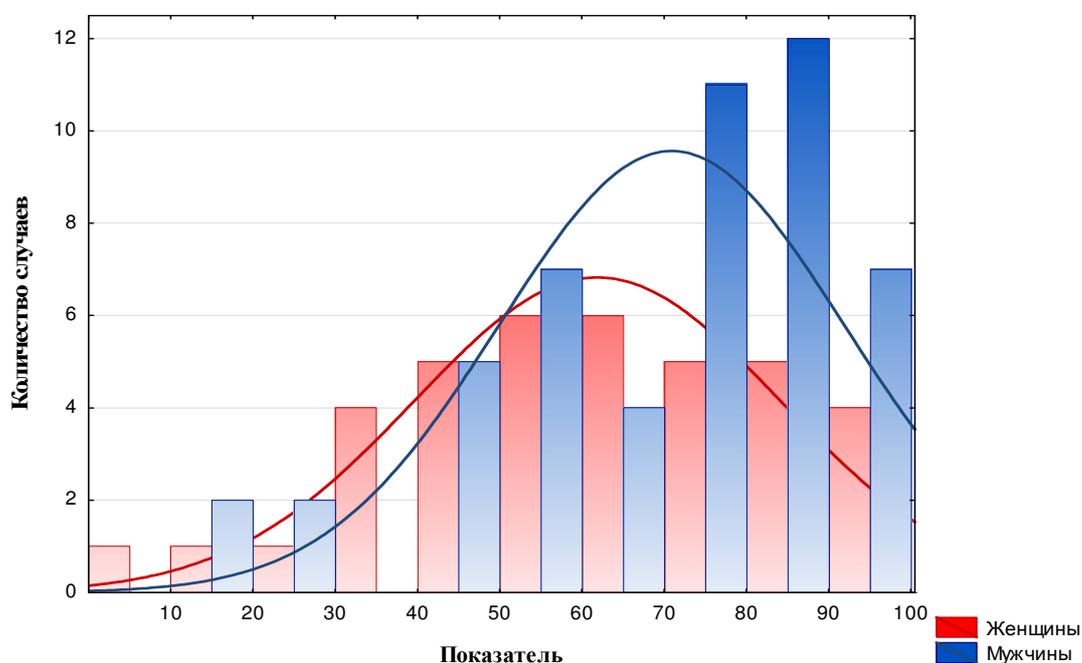


Рис. 74. Диаграмма и график распределения двух групп пациентов (женщины и мужчины) с мозаицизмом X/XУ по количеству (%) лимфоцитов периферической крови, несущих Y-хромосому в кариотипе.

Среднее значение количества клеток, несущих Y-хромосому в кариотипе, у женщин и мужчин составило, $70,56 \pm 20,85\%$ (МЕ (медиана) = 76,67) и $61,58 \pm 22,22\%$ (МЕ (медиана) = 61,58), соответственно. Статистический анализ не выявил значимого отличия по среднему значению количества Y-позитивных клеток в лимфоцитах периферической крови в данных подгруппах ($p > 0.1$).

Поскольку у 17 из 71 пациента с мозаицизмом X/XY выполнено и стандартное цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследования (FISH анализ половых хромосом), мы имели возможность оценить у них расхождения в результатах, полученных разными методами. Согласно результатам, приведенным в таблице 48, количество Y-позитивных клеток в кариотипе у X/XY мозаиков, обнаруженных при использовании стандартного цитогенетического исследования и FISH анализа значимо не отличаются.

Табл. 48. Сравнение показателей количества (%) Y-позитивных клеток у пациентов мужского и женского пола, имеющих мозаицизм X/XY (и его варианты), по результатам стандартного цитогенетического исследования и FISH анализа на лимфоцитах периферической крови (n=17).

Показатель	Количество (%) Y-позитивных клеток в кариотипе (лимфоциты периферической крови)	
	По данным стандартного цитогенетического исследования (%)	По данным FISH анализа (%)
Средний показатель по выборке	68,01	62,39
Медиана	73,29	62,00
Стандартное отклонение	21,09	21,77
Q1 (25%)	47,33	47,00
Q4(75%)	84,25	81,54

Для подтверждения сопоставимости данных, полученных с помощью цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования (рис. 75), проведен дисперсионный анализ, результаты которого также подтвердили отсутствие значимых различий данных подгрупп (Т-критерий Стьюдента= 7,33; SD= 30,9; p=0,35).

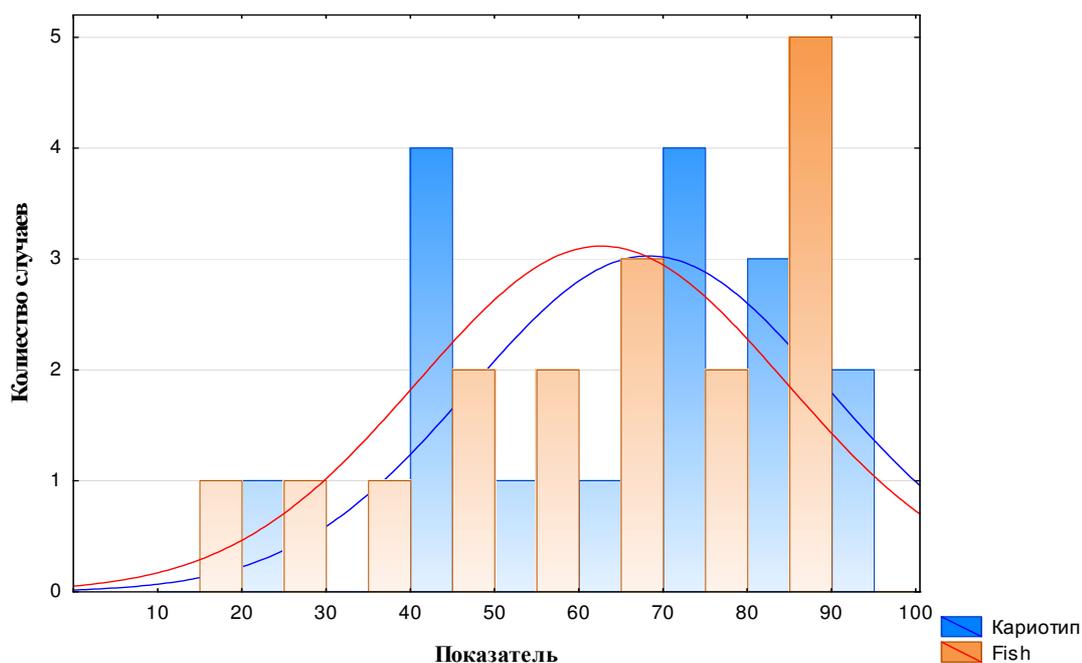


Рис. 75. График распределения двух групп пациентов (женщины и мужчины) с мозаицизмом X/XУ по количеству (%) лимфоцитов периферической крови, несущих Y-хромосому в кариотипе.

Другую группу индивидуумов, у которых исследована взаимосвязь гоносомного мозаицизма и процентной представленности клонов клеток, несущих разных набор половых хромосом, с характером половой дифференцировки / типом формированием пола, составили 20 пациентов, имеющих кариотип (по лимфоцитам периферической крови) 46,XX/46,XY или 46,XX/47,XXY. Среди них также отмечали различие в степени полового развития по женскому, мужскому или двойственному типу строения гениталий.

При анализе корреляционной взаимосвязи у пациентов с мозаицизмом XX/XY или XX/XXY выявлена прямая зависимость степени маскулинизации по Прадеру (0 - 6) и количества (%) Y-позитивных клеток (коэфф. корреляции Спирмена (r)=0,506 при p=0,023, при мощности (P) = 0,82, стандартная ошибка среднего (SD) = 13,4) (рис. 76).

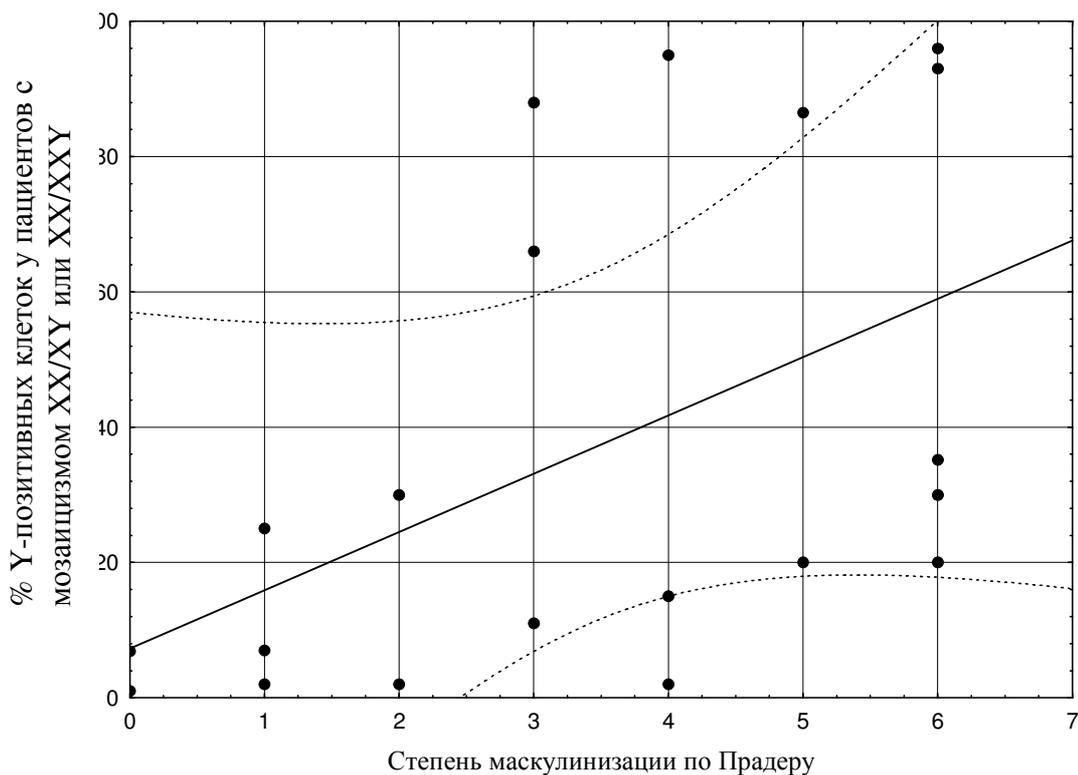


Рис. 76. Распределение пациентов (выборка, n=20) с мозаицизмом XX/XY или XX/XXY по степени маскулинизации по Прадеру и количеству (%) Y-позитивных клеток (выборка, n=20).

У пациенток с нормальным женским фенотипом (степень маскулинизации по Прадеру 0), а также больных с женским фенотипом с признаками легкой или умеренно выраженной маскулинизации (1-ая и 2-ая степень по Прадеру, соответственно) количеством клеток, имеющих в кариотипе Y-хромосому не превышало 30%, тогда как у больных с двойственным (полнеопределенным) строением гениталий и пациентов, имеющих половые органы, развитые полностью по мужскому типу (нормальное мужское или «6-ая» степень по Прадеру) по мужскому с признаками дефицита маскулинизации (4-5-ая степень по Прадеру), количество клеток, имеющих в кариотипе Y-хромосому значительно варьировало от 2% до 98%, составляя $\geq 30\%$ у 6 из 10 пациентов. Следует, однако отметить, что из 6 пациентов, имевших развитие половых органов по мужскому типу или с незначительным дефицитом маскулинизации (5-ая степень по Прадеру), у трех индивидуумов количество клеток с наличием Y-хромосомы составляло 20-35,2%, у

других трех – 86,5-96% от всех проанализированных лимфоцитов. Последнее наглядно свидетельствует, что в половине случаев Y-несущий клон в лимфоцитах периферической крови являлся минорным, несмотря на выраженность маскулинизации. Так как мы не исследовали другие клетки, нельзя исключить то, что распределение в других тканях могло быть отличным от лимфоцитов периферической крови.

Таким образом, результаты анализа гено-фенотипических корреляций у X/XУ мозаиков, имеющих различный пол (мужской или женский), не выявили значимого различия по среднему значению количества Y-позитивных клеток в лимфоцитах периферической крови в данных подгруппах ($70,56 \pm 20,85\%$ и $61,58 \pm 22,22\%$, соответственно). В отличие от X/XУ мозаиков в группе пациентов с кариотипом 46,XX/46,XУ, имеющих различный пол (мужской, женский или двойственное строение гениталий) выявлена прямая зависимость степени маскулинизации от количества (%) клеток (по лимфоцитам периферической крови), имеющих в кариотипе Y-хромосому ($p=0,023$). При количестве клеток, имеющих в кариотипе Y-хромосому более 30%, у индивидуумов с кариотипом 46,XX/46,XУ отмечена выраженная (от двойственного развития гениталий до частичного дефицита маскулинизации) или нормальная маскулинизация половых органов.

3.21. Исследование нарушений сперматогенеза, мейоза и частоты анеуплоидии в сперматозоидах у пациентов с различными мутациями половых хромосом.

С целью оценки влияния различных количественных и структурных мутаций половых хромосом на сперматогенез, мейоз и частоту анеуплоидии в сперматозоидах нами отобрана отдельная группа пациентов. Ее составили 24 мужчин с различными мутациями гоносом из различных клинических групп: с несбалансированными структурными перестройками Y-хромосомы и/или мозаицизмом X/XУ ($n=8$), с перичентрическими инверсиями Y-хромосомы ($n=2$), с аутосомно-гоносомными транслокациями ($n=7$), с синдромом Клайнфельтера и/или дисомией по хромосоме X, кариотипы 47,XXY; 47,XXY/46,XУ ($n=2$), с дисомией Y – 47,XYY ($n=2$), с нормальным мужским кариотипом (46,XУ), имеющих микроделеции Y-хромосомы ($n=3$). Возраст пациентов составлял от 25 до 43 лет. За

исключением пациента с синдромом Клайнфельтера у мужчин данной группы не обнаружено нарушений формирования пола или дефицита маскулинизации. Результаты спермиологического обследования и количественного кариологического анализа НПК из осадка эякулята приведены в таблицах 49-54.

У 16 из 24 (2/3) всех пациентов данной группы по результатам стандартного спермиологического анализа диагностирована азооспермия (n=7) или олигозооспермия тяжелой степени/криптозооспермия (т=9), в последнем случае концентрация сперматозоидов не превышала 0,5 млн/мл. Это свидетельствовало о наличии у них выраженного угнетения сперматогенеза. У 7 других мужчин выявлены более мягкие формы патозооспермии: у пациента AZF74 с транслокацией (22;Y), дисомией Y (пациент 86/24555) – олигозооспермия умеренной степени и одного (пациент С25) из двух мужчин с инверсией Y - олигозооспермия легкой степени, астенотератозооспермия (пациенты 47/AZF1307 и 40452), астенозооспермия (пациент 89/29988 с инверсией Y), тератозооспермия (пациент AZF1325 с мозаицизмом XY/XXY). У одного мужчины данной группы (пациент 318), имевшего транслокацию (Y;14), выявлена нормозооспермия.

Среди структурных перестроек Y-хромосомы наиболее выраженная степень нарушения сперматогенеза выявлена у мужчин с несбалансированными структурными перестройками Y-хромосомы с точками разрыва в коротком плече Y (кольцевая Y-хромосома, изодицентрическая хромосома Yq) (табл. 49), с изодицентрическими хромосомами Yp и терминальными делециями Yq11.2, захватывающими регионы AZFb-c (табл. 50), а также у пациентов с X-аутосомными транслокациями и 4 из 6 пациентов с Y-аутосомными транслокациями (табл. 51). У обследованных пациентов с дисомией Y и инверсиями Y выявлены мягкие формы патозооспермии, что свидетельствует о том, что данные мутации не оказывают выраженного негативного влияния на сперматогенез.

Исследование осадка эякулята у всех пациентов данной группы, в том числе мужчин с азооспермией (по данным стандартного спермиологического исследования) позволило обнаружить у всех обследованных пациентов наличие от десятков до сотен незрелых половых клеток (НПК). У 2 мужчин (пациенты AZF2181 и AZF5387) КА НПК выполнен нами двукратно. Сперматозоиды в

осадке эякулята были обнаружены у 22 из 24 пациентов (табл. таблицах 49-54). Их наличие не было обнаружено у 2 мужчин с терминальными делециями Yq11.2, целиком захватывающими регионы AZFb и/или AZFc (пациенты AZF1985 и Б7216, соответственно). Проведение количественного кариологического анализа НПК позволило выявить повышенное количество (%) мужских половых клеток, находящихся на разных стадиях их развития у 13 пациентов, из них у 8 пациентов с азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени и у 5 пациентов с олигозооспермией средней степени и астено-/тератозооспермией.

Значительно повышенное (от 5 до 25 раз) количество, находящихся на допахитенных стадиях (в прелептотене-зиготене) профазы I мейоза, обнаружено у пациента с кольцевой хромосомой Y (18%), у мужчины с терминальной Yq делецией с потерей региона AZFc (пациент Б7216), а также у обоих мужчин с дисомией Y – пациенты 24555 и 40452 (4,4% и 7%). У последних двух пациентов также отмечено наибольшее среди обследованных мужчин количество (5,4 и 8%, соответственно) НПК на стадии пахитены, а у одного (пациент 40452) также и на стадии диплотены (5,3%) профазы I мейоза. Следует отметить, что у 4 пациентов с азооспермией количество НПК было недостаточным (<70), что затрудняло оценку прохождения различных стадий сперматогенеза. Явно повышенное количество нераззошедшихся (ядер) сперматид обнаружено у 3 пациентов с (AZF1777, AZF623 и AZF5387), у которых в кариотипе обнаружены транслокация (Y;1)(p11.3;p34), изодицентрические хромосомы Yr и Yq, соответственно (табл. 49-51).

Полученные данные свидетельствуют, что у мужчин с абберациями Y-хромосомы состояние сперматогенеза значительно варьирует, при этом его сохранность и степень нарушения деления и созревания мужских половых клеток зависят от типа мутации и расположения точек разрыва. Так, несбалансированные структурные перестройки Y с точками разрыва в дистальной части его короткого плеча (в локусе Yp11.3), например, в случаях кольцевых Y и изодицентрических Yq хромосом, приводят к выраженному нарушению прохождения мейотических делений, очевидно, нарушая конъюгацию и рекомбинацию хромосом X и Y, что приводит к полному или частичному блоку сперматогенеза надпахитенных стадиях и в пахитене профазы I мейоза. У обследованных нами мужчин с изодицентрическими Yq хромосомами не отмечено

низкого роста, что указывало на то, что в данных случаях точки разрыва располагались дистальнее гена *SHOX*, вероятно, в терминальной области Yp11.3, с сохранением на перестроенной Y-хромосоме двух копий почти всего региона PAR1. У обоих пациентов с изодичетрическими Yq хромосомами не обнаружено мозаицизма по перестроенной хромосоме, что свидетельствует о митотической стабильности данных aberrаций Y-хромосомы.

В случае дицентрических хромосом и изохромосом по короткому плечу область нормальной X-Y рекомбинации (PAR1 регион Y-хромосомы) остается интактной, однако сперматогенез также нарушен вследствие сочетания негативных эффектов данных структурных перестроек. Один из механизмов угнетения сперматогенеза при этом обусловлен, соответственно, потерей части или всего локуса AZF, содержащего гены, контролирующие деление и созревание мужских половых клеток. У обследованных нами мужчин с дицентрическими хромосомами Yp выявлены делеции AZFb и/или AZFc региона. Наличие данных делеций даже в отсутствие дицентрической перестройки Y-хромосомы (интерстициальные Yq11.2 делеции) приводит к выраженному угнетению сперматогенеза и секреторной азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени. Присутствие на Y-хромосоме двух регионов PAR1 может являться фактором, нарушающим процессы конъюгации и рекомбинации половых хромосом. Кроме того, наличие двух центромер (одна из которых в большинстве случаев инактивируется, вызывая образование псевдоизодичетрической хромосомы Y) регионов PAR1, расположенных в дистальных частях коротких плеч изохромосом isoYp и изодичетриков idic(Yp) что приводит к нарушению митотической стабильности данных перестроек Y-хромосомы. В результате этого у многих индивидуумов с изохромосомами isoYp и изодичетриков idic(Yp) обнаруживают клон 45,X, что отмечено и среди обследованных нами пациентов из данной и других клинических групп (пациентки с синдромом Шерешевского-Тернера, пациенты мужского пола со несбалансированными структурными перестройками и/или мозаицизмом X/XY). Гомосомный мозаицизм в данном случае является дополнительным фактором, влияющих не только собственно на гаметогенез, но и характер дифференцировки и развитие гонад.

Таблица 49.

Результаты спермиологического обследования и количественного кариологического анализа НПК из осадка эякулята у мужчин с несбалансированными структурными перестройками Y-хромосомы с точками разрыва в коротком плече Y.

Показатели СА и КА НПК	Норма	mos45,X/46,X,r(Y) ¹ (пациент SRY161)	46,X,psudic(Y)(p11.32) (пациент AZF5387)	46,X,psudic(Y)(p11.32) (пациент AZF6221)
Концентрация сперматозоидов	≥15 млн/мл	0,05 млн/мл	0 млн/мл	0,12 млн/мл
индекс НПК	2-4%	103%*	не рассчитывали (6 атипичных сперматозоидов и 426 НПК/ 294 НПК на 500 полей зрения)	не рассчитывали (12 атипичных сперматозоидов и 64 НПК на 500 полей зрения)
прелептогена-зиготена	0,66 +/- 0,16%	18%*	0,5% /1,4%	0%
пахитена	0,45 +/- 0,10%	0,2%	0,5% /2,4 (6%) ²	0%
диплотена	1,11 +/- 0,26%	3,8%*	0,5%/1%	0%
диакинез, МI/МII	0,04 +/- 0,02%	0,6%*	0% /0%	0%
сперматоциты II + сперматиды	91,99 +/- 0,89%	62,4%	89,2%/85%	100%
неразошедшиеся сперматиды	22,98 +/- 2,65%	29%	44,7%/36%	36%
неидентифицированные половые клетки	5,85 +/- 0,85%	14,8%*	9,3%/6,6%	0%

Примечания: 1 – кольцевая хромосома, r(Y) образована в результате точек разрыва в коротком и длинном плече Y-хромосомы.

2- в скобках указан процент НПК на стадии пахитены профазы I мейоза с учетом, что 30% клеток данной стадии были разрушенными (первично при подсчете были отнесены к неидентифицированным клеткам).

Таблица 50.

Результаты спермиологического обследования и количественного кариологического анализа НПК из осадка эякулята у мужчин с несбалансированными структурными перестройками Y-хромосомы с точками разрыва в длинном плече Y.

Показатели СА и КА НПК	Норма	46,X,psu idic(Y)(q11.2) (пациент CV129)	45,X/46,X,idic(Y)(q11.2); del AZFc (пациент AZF623)	46,X,del(Y)(q12); del AZFc (пациент Б721)	46,X,del(Y)(q11.2); del AZFc (пациент AZF437)	46,X,del(Y)(q11.2); del AZFb+c (пациент AZF1985)
Концентрация сперматозоидов	≥15 млн/мл	0 млн/мл	0 млн/мл	0 млн/мл	0,05 млн/мл	0 млн/мл
индекс НПК	2-4%	не рассчитывали (на 1000 полей зрения 7 атипичных сперматозоидов и 43 НПК)	не рассчитывали (18 атипичных сперматозоидов)	не рассчитывали (на 1500 полей зрения 95 НПК, сперматозоиды не обнаружены)	не рассчитывали	не рассчитывали (на 1500 полей зрения 19 НПК, сперматозоиды не обнаружены)
прелептогена-зиготена	0,66 +/- 0,16%	0%	0%	8,4%*	1,8%*	0%
пахитена	0,45 +/- 0,10%	0%	0%	10,5%*	0%	0%
диплотена	1,11 +/- 0,26%	0%,	0%	3%*	0,6%	0%
диакинез, МI/МII	0,04 +/- 0,02%	0%	0%	0%	0%	0%
сперматоциты II + сперматиды	91,99 +/- 0,89%	100%	91,9%	67,6%	90%	89%
неразошедшиеся сперматиды	22,98 +/- 2,65%	0%	64%*	4%	37,5%	11%
неидентифицированные половые клетки	5,85 +/- 0,85%	0%	8,1%	10,5%	7,6%	11%

Примечания: 1 – в скобках указан процент НПК на стадии пахитены с учетом, что 30% клеток на данной стадии были разрушенными (первично при подсчете были отнесены к неидентифицированным клеткам). Звездочкой (*) отмечены показатели КА НПК превышающие нормативные в 2 и более раза.

Таблица 51.

Результаты спермиологического обследования и количественного карилогического анализа НПК из осадка эякулята у мужчин с X-аутосомными и Y-аутосомными транслокациями.

Показатели СА и КА НПК	Норма	46, Y, t(X;6) (q13;p22) (пациент AZF2181)	46, Y, t(X;5) (q24;q33.2) (пациент AZF513)	46, XY, t(Y;8) (q11.2;q11.2) (пациент AZF6248)	46, X, t(Y;1) (p11.3;p34) (пациент AZF1777)	46, XY, der(21) t(Y;21) (q11.2;q22.3) (пациент 88/26822)	45, X, -Y, der(22) t(Y;22) (пациент AZF74)	46, X, t(Y;14) (q12;p12) (пациент 318)	45, X, -Y, der(5)t(5;Y) (p15.3;p11.3) (пациент Б.С. 837)
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	≥15 млн/мл	0 млн/мл	0,1 млн.	0 млн/мл	0,05 млн/мл	0 млн/мл	3,5 млн/мл	78 млн/мл	0,45 млн.
индекс НПК	2-4%	не рассчитывали (6/2 атипичных сперматозоидов и 309/180 НПК на 450/500 зрения полей)	626%*	Не рассчитывали (4 атипичных сперматозоида и 436 НПК на 300 полей зрения)	Не рассчитывали (4 атипичных сперматозоида и 339 НПК на 300 полей зрения)	Не рассчитывали (81 атипичных сперматозоида и 240 НПК на 450 полей зрения)	38%*	7,9%*	Не рассчитывали
прелептотена-зиготена	0,66+/-0,16%	1,6%/4%*	1,1%	4,6%*	0%	0%	0%	0%	2%*
пахитена	0,45+/-0,10%	0,6%/0%	0%	1,6%*	0%	0%	0%	0%	0%
диплотена	1,11+/-0,26%	0%/1,6%	0%	2,3%	0%	0%	0%	0%	0,7%
диакинез, МI/МII	0,04+/-0,02%	0%/0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
сперматциты II + сперматиды	91,99+/-0,89%	86,4%/83%	87,8%	83%	88,5%	90%	93,5%	96,8%	90,3%
неразошедшиеся сперматиды	22,98+/-2,65%	11%/10%	25,4%	18%	46,6%	15,8%	32%	28,7%	17%
неидентифицированные половые клетки	5,85+/-0,85%	11,4%/11,4%	11,1%	8,5%	11,5%	10%	6,5%	3,2%	7%

Примечание: Звездочкой (*) отмечены показатели КА НПК превышающие нормативные в 2 и более раза.

Таблица 52.

Результаты спермиологического обследования и количественного кариологического анализа НПК из осадка эякулята у мужчин с дисомией Y и мужчин с перисоматическими инверсиями Y-хромосомы.

Показатели СА и КА НПК	Норма	47,XYУ (пациент 24555)	47,XYУ (пациент 40452)	47,X,inv(Y)(p11.2q11.2) (пациент 29988)	47,X,inv(Y)(p11.2q11.2) (пациент С25)
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	≥15 млн/мл	3,6 млн/мл	21 млн/мл	82 млн/мл	7,4 млн/мл
индекс НПК	2-4%	2,8%	10%*	6,6%	Не рассчитывали
прелептотена-зиготена	0,66 +/- 0,16%	7%*	4,4%*	0,9%	0%
пахитена	0,45 +/- 0,10%	5,4%*	8%*	0,3%	0%
диплотена	1,11 +/- 0,26%	0%	5,3%*	0%	0%
диакинез, МI/МII	0,04 +/- 0,02%	0%	0%	0%	0%
сперматоциты II + сперматиды	91,99 +/- 0,89%	82%	82,3%	87,7%	100%
неразошедшиеся сперматиды	22,98 +/- 2,65%	9%	10%	25%	25%
неидентифицированные половые клетки	5,85 +/- 0,85%	5,4%	0%	11,1%	12%

Примечания: 1 – в скобках указан процент НПК на стадии пахитены с учетом, что 30% клеток на данной стадии были разрушенными (первично при подсчете были отнесены к неидентифицированным клеткам).

Звездочкой (*) отмечены показатели КА НПК превышающие нормативные в 2 и более раза.

Для сбалансированных аутосомно-гоносомных транслокаций не характерно нарушение дифференцировки гонад и формирования пола, однако у мужчин-носителей часто отмечают нарушение сперматогенеза и бесплодие [Gardner et al., 2012]. Признаки двойственности половой развития или дефицит маскулинизации не отмечены у мужчин с X-аутосомными и сбалансированными Y-аутосомными транслокациями. У 4 пациентов с X-аутосомными транслокациями (табл. 43 и 51) выявлено выраженное нарушение сперматогенеза (азооспермию и олигозооспермию тяжелой степени). Выполнен у двух из них КА НПК позволил обнаружить в осадке эякулята увеличенное количество НПК, в том числе на допахитенных стадиях (табл. 51). В отличие от них у мужчин с Y-аутосомными транслокациями отмечено широкая вариабельность в состоянии сперматогенеза (от нормозооспермии до азооспермии), что очевидно, типом транслокации, отсутствием или потерей фрагмента Y-хромосомы, расположением точек разрыва.

Другие исследователи также отмечают, что большинство мужчин-носителей аутосомно-гоносомных транслокаций страдают бесплодием [Mattei et al., 1982; Ma et al., 2003]. Единичные исследования сегрегации хромосом у мужчин с X-аутосомными транслокациями и немногочисленные – с Y-аутосомными транслокациями свидетельствуют о различии у них в частоте несбалансированных сперматозоидов по материалу хромосом, вовлеченным в перестройку [Giltay et al., 1999; Alves et al., 2002; Buonadonna et al., 2002; Pinho et al., 2005; Perrin et al., 2008; 2009]. В редких случаях X-аутосомных транслокаций описано наступление беременности и рождение здоровых детей после проведения ICSI и крайне редко – естественным путем после длительного бесплодия [Ma et al., 2003]. Случаи сохранения фертильности у мужчин с Y-аутосомными транслокациями редки [Vialard et al., 2009]. У единственного пациента данной группы, у которого в кариотипе присутствовала транслокация гетерохроматина дистальной части длинного плеча Y-хромосомы (локус Yq12) на короткое плечо акроцентрической хромосомы (14p), диагностировали нормозооспермию, т.е. сперматогенез не был нарушен. Очевидно транслокация Yq12 на короткое плечо акроцентрической хромосомы (чаще хромосомы 15) является относительно благоприятным типом гоносомно-аутосомных транслокаций, характеризующимся возможностью сохранением репродукции, как у мужчин, так и у женщин [Chen et al., 2007].

3.22. Исследование частоты анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с аномалиями половых хромосом в кариотипе.

С целью изучения влияния аномалий гоносом на частоту анеуплоидий в сперматозоидах нами обследованы группа мужчин с различными структурными или численными мутациями половых хромосом в кариотипе. С помощью FISH-анализа исследована частота анеуплоидии по 5 хромосомам (13, 18, 21, X и Y) у 8 пациентов. В качестве референсных значений частоты анеуплоидий в сперматозоидах по исследованным хромосомам использовали результаты, полученные ранее [Гордеева, 2013]. Результаты FISH-анализа анеуплоидии по гоносомам и по аутосомам в сперматозоидах представлены в таблицах 56 и 57, соответственно.

У 6 из 8 мужчин отмечено нарушение репродуктивной функции: первичное (n=5) или вторичное бесплодие (n=1) в браке. У двух других мужчин репродуктивная функция была сохранена, по данным спермиологического обследования у них выявлена астенотератозооспермия (коды пациентов 47 и 89, соответственно). В анамнезе данных пациентов отмечено рождение детей, имеющих аномалию хромосом и/или врожденные пороки развития.

Пациенты, которым проведено исследование анеуплоидии в гаметах имели следующие аномалии половых хромосом/кариотипы:

- дисомию Y в регулярной форме – 47,XY₂ (n=1),
- синдром Клайнфельтера – 47,XXY (n=1),
- низкоуровневый гоносомный мозаицизм без синдрома Клайнфельтера – кариотип mos47,XXY[3]/46,XY[31] (n=1),
- перичентрическую инверсию Y-хромосомы – 46,XY,inv(Y)(p11.2q11.23) (n=1),
- Y-аутосомную транслокацию – 46,XY,der(21)t(Y;21)(q11.2;q22.3) (n=1),
- микроделеции длинного плеча Y-хромосомы, 46,XY (n=3).

Мужчины с Yq микроделециями имели нормальный мужской кариотип (46,XY). У всех из них микроделеции располагались в локусе Yq11.23, в двух случаях представленные полными делециями AZFc региона (del 'b2/b4') и в одном – частичной делецией данного региона (del 'b2/b3'). В последнем случае носитель делеции являлся фертильным молодым мужчиной с астенотератозооспермией, являвшийся отцом пациента с тетрасомией Y (AZF1306), описанного выше.

Все мужчины, которым оценивали анеуплоидию в гаметах, имели различные отклонения от нормальных показателей эякулята (табл. 53). Степень нарушения/сохранности сперматогенеза и форма патозооспермии у них варьировала от легкой – тератозооспермия (n=1) и астенотератозооспермия (n=2), умеренной и среднетяжелой – олигоастенотератозооспермия I-III степени (n=4) до выраженного угнетения сперматогенеза – секреторная азооспермии (n=1).

Признаки частичного блока сперматогенеза на стадиях прелептотены-зиготены/пахитены профазы I мейоза выявлены у 4 из 6 пациентов, среди них: у пациента с дисомией Y, имевшего олигоастенотератозооспермию II степени, пациента с гоносомным мозаицизмом с низкопроцентным клоном 47,XXY (код пациента AZF1325), фертильного мужчины с нормальным мужским кариотипом (46,XY) и астенотератозооспермией, у которого родился сын с тетрасомией Y (код пациента 47), а также у одного из двух обследованных пациентов с полной AZFc (b2/b4) делецией, имевшего олигоастенотератозооспермию I степени (пациент AZF1076). У последнего из них среди НПК также выявлены клетки на стадиях диакинеза/MI, MII (1,5%).

Повышенное количество неразошедшихся ядер сперматид (30-37%), свидетельствующее о нарушении второго мейотического деления, отмечено у мужчины с делецией AZFc (b2/b4), имевшего олигоастенотератозооспермию I степени (пациент AZF1076), у фертильного мужчины с астенотератозооспермией, являющегося отцом пациента с тетрасомией Y, а также у мужчины с низкоуровневым гоносомным мозаицизмом по клону 47,XXY (код пациента 87).

У 5 мужчин (коды пациентов 16, AZF1076, 47, 26822 и 89) обнаружено повышенное количество (10-22%) неидентифицированных дегенеративных мужских половых клеток, что свидетельствует об повышении активности апоптотически процессов в деления и созревания незрелых мужских половых клетках. У пациента с транслокацией t(Y;21), имевшего секреторную азооспермию, не удалось выявить признаки затруднения в прохождении каких-либо стадий мейоза. Однако это могло быть связано с малым количеством как зрелых, так и незрелых половых клеток, наблюдающееся при выраженном угнетении сперматогенеза.

Таблица 53

Сведения о пациентах, у которых выполнено исследование частоты анеуплоидии в сперматозоидах.

Код пациента	Возраст, лет	Диагноз	Заключение спермиологического исследования/форма патозоосермии	Карิโอтип	Дополнительные сведения
16	30	Бесплодие I	олигоастенотератозооспермия тяжелой степени	46,XY	Полная делеция AZFc региона (del 'b2/b4')
AZF1076	43	Бесплодие I	олигоастенотератозооспермия легкой степени	46,XY	Полная делеция AZFc региона (del 'b2/b4')
47 (AZF1307)	25	Здоров	астенотератозооспермия	46,XY	Частичная делеция AZFc региона (del 'b2/b3'), унаследованная сыном, имеющим мозаичную форму тетрасомии Y (кариотип mos45,X/49,XYYY)
85 (24555)	30	Бесплодие I, Дисомия Y	олигоастенотератозооспермия средней тяжести	47,XY	Микроделеции Y-хромосомы не обнаружены
86	27	Синдром Клайнфельтера. Бесплодие I	олигоастенотератозооспермия тяжелой степени	47,XXY	Микроделеции Y-хромосомы не обнаружены
AZF1325 (87)	32	Бесплодие II	тератозооспермия	mos 47,XXY[3]/46,XY[97]	Микроделеции Y-хромосомы не обнаружены
88 (26822)	38	Бесплодие I	азооспермия	46,XY,der(21)t(Y;21)(q11.2;q22.3)	Микроделеции Y-хромосомы не обнаружены
89 (29988)	32	ВПР у ребенка	астенозооспермия	46,XY,Yqh+,inv(Y)(p11.2q11.23), ish der(Y)(WCP Y+,SR Y+)	Имеет 3 здоровых детей и одного с ВПР. Микроделеции Y-хромосомы не обнаружены

Таблица 54

Результаты стандартного спермиологического анализа и количественного кариологического анализа незрелых половых клеток из осадка эякулята у мужчин, которым проведен FISH-анализ сперматозоидов.

Код пациента	Данные спермиологического анализа				Данные кариологического анализа незрелых половых клеток							Неидентифицируемые половые клетки (%)					
	Объем эякулята, мл.	Кол-во сперматозоидов в 1 мл. эякулята, млн.	Подвижность сперматозоидов ('PR') (%)	Патологические формы сперматозоидов (%)	Сперматозоиды	Индекс НПК (Импк) (%)	НПК/поля зрения	Сперматогонии (%)	Сперматозиты I				Сперматозиты II и сперматиды				
Норма	≥1,5 мл	15 млн. и более	≥32%	≤96%	>1000	2-4	н.о.	н.о.	препаратотенезиготена (%)	пахитена (%)	диплотена (%)	диакинез/МП (%)	сперматозиты II (%)	сперматиды (%)	сперматозиты II и сперматиды (%)	сперматиды (%)	
16	4	0,15	0	100	13	-	20/1500	-	0,66+/-0,16	0,45+/-0,10	1,11+/-0,02	0,04+/-0,02	91,99+/-0,89	22,98+/-2,65	90	28	5,85+/-0,85
32 (AZF1076)	2	10	0	100	>1000	7,4	133/1200	-	4,5*	2,3*	-	1,5	69,7	34	-	-	22*
47 (AZF1307)	3	88	11	100	>1000	12,3	365/150	-	3,8*	-	0,8	-	74	37	-	-	21,4*
85 (24555)	4,5	3,6	25	91	>1000	2,7	56/1200	-	7*	5,4*	-	-	82	9	-	-	5,4
86	1,5	0,1	0	100	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
87	6,5	39	33	97	>1000	16,7	329/70	-	2,4*	0,3	-	-	91,1	30	-	-	6,2
88 (26822)	2	0	0	-	81	-	240/450	-	-	-	-	-	90	15,8	-	-	10
89 (29988)	1,5	82	24	92	>1000	6,6	316/190	-	0,9	0,3	-	-	87,7	25	-	-	11,1

Примечания: Н.о. – не определено, нормативные показатели по данным показателя КА НПК не определены. Н.и. – не исследовали. Звездочкой (*) отмечены показатели КА НПК превышающие норму в 2 и более раза

У пациента с синдромом Клайнфельтера КА НПК не проводили, а достоверно оценить долю стадий сперматоцитов I у одного из двух пациентов, имевших делецию AZFc (b2/b4), не представлялось возможным также в связи с недостаточным количеством половых клеток, обнаруженных в осадке эякулята.

3.22.1. Анализ мейотической сегрегации хромосом X и Y у мужчин с численными или структурными мутациями половых хромосом.

Анализ мейотической сегрегации хромосом X и Y выполнен у 6 пациентов с мутациями половых хромосом. Соотношение доли X- и Y-несущих сперматозоидов в эякуляте значимо не отличалось от соотношения 1:1 у всех обследованных пациентов (табл. 53). Увеличение уровня анеуплоидии по половым хромосомам более 1% (т.е. условной нормы) выявлено у мужчин, имевших анеусомию по гоносомам (47,XXY; 47XY₂ и мозаицизм 46,XY/47,XXY), а также у пациента с транслокацией t(Y;21). Наибольшая частота анеуплоидии по гоносомам обнаружена у пациента с СК и у мужчины с Y-аутосомной транслокацией. Частота дисомии по гоносомам у них составила – 1,03% и 1,78%, что примерно в 2-4 раза превышает нормативные показатели, полученные для контрольной группы, соответственно. Значительное повышение (на 1 порядок и более) частоты YY дисомии в гаметах (0,91%) определено у пациента с транслокацией t(Y;21). У него, а также у 47,XY₂ мужчины отмечено значимое повышение числа сперматозоидов с дисомией X (0,36% и 0,32%, соответственно), что свидетельствует о нарушении расхождения X-хроматид во втором мейотическом делении при данных мутациях хромосомы Y.

Не столь выраженное (примерно в 2 раза от контрольного) повышение доли анеуплоидных по гоносомам гамет обнаружено и у пациента с перичентрической инверсией Y-хромосомы и у отца пациента с тетрасомией Y: 0,83% и 0,70%, соответственно. При этом доля YY сперматозоидов у последнего составила 0,08%, что не отличалось от соответствующего показателя для контрольной группы (0,06±0,02%). Частота дисомии и нуллисомии по половым хромосомам у мужчины с низкопроцентным мозаицизмом по клону 47,XXY, у пациента с синдромом Клайнфельтера, у мужчины с дисомией Y и у носителя Y-аутосомной транслокации составила 0,69%, 0,99%, 0,81% и 1,96%; и 0,85%, 1,21%, 0,57% и 0,85%, соответственно. Максимальный уровень нуллисомии по гоносомам отмечен у пациента с СК (1,21%).

Частота встречаемости анеуплоидии по хромосомам X и Y в сперматозоидах мужчин, имеющих численные или структурные мутации половых хромосом.

Хромосомный набор ПК	Код пациента 28435 (AZF1325) mos 47,XXY [3]/46,XY[31]	Код пациента 86 47,XXY	Код пациента 85 (24555) 47,XXY	Код пациента 88 (26822) 46,XY, der(21)t(Y;21) (q11.2;q22.3)	Код пациента 89 (29988) inv(Y) (p11.2q11.23)	Код пациента 47 (AZF1307) 46,XY del AZFc b2/b3	Мужчины с нормозооспермией (контрольная группа)
23,X	46,67 (1207)	48,00 (1707)	50,08 (2807)	48,11 (1468)	48,92 (1597)	48,95 (1123)	50,07±0,58
23,Y	51,23 (1325)	46,45 (1652)	48,33 (2709)	47,75 (1457)	50,09 (1635)	49,95 (1146)	49,17±0,50
24,XY	0,65 (17)	0,61 (22)	0,19 (11)	0,69 (21)	0,18 (6)	0,13 (3)	0,17±0,11
24,XX	-	0,16 (6)	0,32 (18)	0,36 (11)	0,06 (2)	0,21 (5)	0,04±0,02
24,YY	0,04 (1)	0,22 (8)	0,30 (17)	0,91 (28)	0,18 (6)	0,08 (2)	0,06±0,02
22,-XY	0,85 (22)	1,21 (43)	0,57 (32)	0,85 (26)	0,39 (13)	0,21 (5)	0,29±0,08
25,XXY	-	0,08 (3)	-	-	-	0,04 (1)	-
25,XXY	-	-	-	-	-	-	-
46,XY	0,27 (7)	0,84 (30)	0,03 (2)	0,49 (15)	0,03 (1)	0,17 (4)	0,20±0,14
46,XX	0,11 (3)	0,98 (35)	0,05 (3)	0,13 (4)	0,03 (1)	0,09 (2)	0,06±0,03
46,YY	0,19 (5)	0,89 (32)	0,11 (6)	0,29 (9)	0,06 (2)	0,13 (3)	0,08±0,05
47,XXY	-	0,05 (2)	0,01 (1)	-	-	-	-
47,XXY	-	0,02 (1)	-	-	0,03 (1)	0,04 (1)	-
47,YYY	-	-	-	0,03 (1)	-	-	-
48,XXYY	-	-	-	0,03 (1)	-	-	-
92,XXYY	-	-	-	0,06 (2)	-	-	-
Всего:	1,55%	2,32%	1,39%	2,83%	0,83%	0,70%	0,9±0,17%

Примечания: в скобках указано количество проанализированных клеток. Жирным шрифтом отмечены значения в 2 и более раза превосходящие референсные.

Несмотря на то, что инверсия является сбалансированной перестройкой и, как правило, не нарушает X-Y рекомбинацию частота, так как не затрагивает регионы *PAR1* и *PAR2* у носителя перичентрической инверсии Y-хромосомы – *inv(Y)(p11.2q11.23)* уровень анеуплоидных по гоносомам сперматозоидов почти в 2 раза превышал референсные значения. Вероятно повышенное количество гамет с нуллисомией по гоносомам или с дисомией Y в данном случае обусловлено увеличением случаев нерасхождения сестринских Y-хроматид во втором мейотическом делении.

У мужчины, имевшего регулярную дисомию по хромосоме Y и у пациента с синдромом Клайнфельтера, среди анеуплоидных сперматозоидов обнаружены варианты анеуплоидных гамет не только с дисомией и нуллисомией, но и с полисомией по гоносомам. Единичные сперматозоиды с трисомией XYY обнаружены в эякуляте пациента с СК (0,08%), а также у пациента 47 (0,04%) с делецией b2/b3 – отца пациента (AZF1306) с мозаичной формой тетрасомии Y, описанного выше.

Сперматозоиды с трисомией Y, а также с XXYY набором гоносом обнаружены только у пациента с транслокацией t(Y;21), имевшего самый высокий среди обследованных мужчин уровень анеуплоидии. Среди мужчин контрольной группы гаплоидные сперматозоиды с трисомией по гоносомам, сперматозоиды с диплоидией в сочетании с трисомией по гоносомам, а также тетраплоидные гаметы не были обнаружены. Важно отметить, что у обследованных мужчин значительно преобладали сперматозоиды с нормальным кариотипом (23,X и 23,Y) – 94,5-99,0% (по данным анализа анеуплоидии по гоносомам). Полученные данные свидетельствуют в пользу наличия негативного отбора анеуплоидных мужских половых клеток при их созревании у пациентов, имеющих гоносомную анеусомию в кариотипе.

3.22.2. Исследование частоты анеуплоидии по аутосомам в сперматозоидах у мужчин с числовыми или структурными аномалиями половых хромосом.

Оценка уровня анеуплоидий по аутосомам (13, 18 и 21) выполнена у 6 мужчин (табл. 55).

Таблица 56

Частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией по хромосомам 13, 18 и 21 у 6 мужчин с мутациями половых хромосом.

Код пациента	Кариотип; делеция AZFc	Количество проанализированных ПК	Хромосома 13		Хромосома 18		Хромосома 21		Диплоидные ПК
			нуллисомия	дисомия	нуллисомия	дисомия	нуллисомия	дисомия	
16	46,XY; del 'b2/b4'	393	1,78%	0,51%	н.и.	н.и.	0,76%	1,78%	0,76%
32	46,XY; del 'b2/b4'	3105	0,57%	0,19%	н.и.	н.и.	0,67%	0,77%	0,64%
47	46,XY; del 'b2/b3'	2000	0,05%	0,10%	0,21%	0,04%	0,15%	0,00%	0,40%/0,39%
85	47,XY	5080/5605	0,09%	0,09%	0,16%	0,16%	0,39%	0,59%	0,17%/0,20%
87	mos46,XY[31]/47,XXY[3]	2000/2586	0,50%	0,20%	0,23%	0,15%	0,25%	0,40%	0,60%/0,58%
89	46,XY, Yqh+, inv(Y)(p11.2q11.23)	3257/3264	0,27%	0,06%	0,27%	0,06%	0,39%	0,31%	0,15%/0,15%
Контроль *	46,XY	≥5000	0,13±0,03%	0,11±0,04%	0,09±0,01%	0,05±0,02%	0,22±0,07%	0,20±0,08%	0,40±0,18%

Примечания: * - Контрольная группа (здоровые мужчины, являющиеся донорами спермы и/или имеющие нормозооспермию).

Н.и. – не исследовали. Через косую черту приведены значения количества проанализированных половых клеток и частоты анеуплоидии у 4 пациентов (коды 47, 85, 87 и 89), которым проводили FISH-анализ: на хромосомы 13 и 21, и на хромосомы 18, X и Y.

Жирным шрифтом отмечены значения в 2 и более раза превосходящие референсные.

Из них: 2 пациента (коды 16 и 32) имели нормальный мужской кариотип (46,XY) и полную AZFc (b2/b4) делецию, мужчина-носитель делеции b2/b3 – отец пациента с тетрасомией Y (код пациента 47), мужчина с дисомией Y (код пациента 85), XY/XXY мозаик (код пациента 87) и пациент с перичентрической инверсией Y (код пациента 89). За исключением одного из двух мужчин с делецией AZFc (b2/b4), у которого выявлено выраженное угнетение сперматогенеза, количество ПК в осадке эякулята у которого было невелико (менее 300), у остальных 5 пациентов количество сперматозоидов, исследованных с помощью FISH-анализа, составило от 2 до 5 тысяч. У данного пациента, имевшего олигозооспермию тяжелой степени (с концентрацией сперматозоидов 0,15 млн./мл) отмечена наибольшая среди всех обследованных частота анеуплоидий по аутосомам (по хромосоме 13 – 2,29%, по хромосоме 21 – 2,54%), что от 3 до 13 раз превышало референсные значения частоты нуллисомии и дисомии по хромосомам 13, 18 и 21. У мужчины с полной делецией AZFc (b2/b4), у которого концентрация сперматозоидов составляла 10 млн/мл, также обнаружена повышенная (примерно в 3 раза) частота анеуплоидий по хромосомам 13 и 21.

У мужчины с регулярной дисомией Y (47,XY₂) выявлена умеренно повышенная частота дисомии по хромосомам 18 и 21, у пациента с низкоуровневым (3%) гоносомным мозаицизмом по клону 47,XXY – увеличенное количество сперматозоидов с анеуплоидией по хромосомам 13 и 21. У мужчины с перичентрической инверсией хромосомы Y отмечали повышенную (примерно в 2-3 раза) частоту нуллисомии по всем трем исследованным аутосомам (хромосомы 13, 18 и 21), при этом доля диплоидных сперматозоидов у него и у пациента с дисомией Y была наименьшей даже по сравнению с соответствующим показателем, полученным для мужчин контрольной группы.

Незначительно повышенное количество диплоидных гамет отмечено у обоих мужчин, имевших полную AZFc (b2/b4) делецию, а также у мужчины с гоносомным мозаицизмом (47,XXY/46,XY). Кроме первичного бесплодия у данного пациента не отмечали фенотипических признаков синдрома Клайнфельтера, таких как гипогонадизм, а нетяжелая форма тератозооспермии у него свидетельствовала об отсутствии выраженных нарушений сперматогенеза. Несмотря на то, что у данного пациента не были исследованы другие соматические

клетки, кроме лимфоцитов периферической крови, отсутствие клинических симптомов СК у него косвенно свидетельствует о преобладании нормального (46,XY) клона в других органах и тканях, в том числе в тестикулярной ткани. Вероятно, выявленный низкоуровневый мозаицизм по клону 47,XXY связан с митотической нестабильностью соматических клеток, что наблюдают в том числе у здоровых мужчин с повышенной частотой дисомии по гоносомам в сперматозоидах [Rubes et al., 2002].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значимом увеличении частоты анеуплоидии как по половым хромосомам (X, Y), так и по аутосомам в сперматозоидах пациентов с численными или структурными перестройками Y в кариотипе. Частота анеуплоидии у них превышает нормативные показатели (у фертильных мужчин) в 2-4 раза и коррелирует с тяжестью мутаций гоносом, а также со степенью нарушения сперматогенеза. Среди обследованных пациентов наибольшая частота количественных мутаций половых хромосом в сперматозоидах выявлена при регулярной дисомии X (синдроме Клайнфельтера) и Y-аутосомной транслокации, t(Y;21), а для аутосом – при полной AZFc делецией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований, в том числе данной работы, наглядно свидетельствуют о важной роли половых хромосомы человека и их генов в контроле различных этапов и процессов развития и функции репродуктивной системы. Числовые и структурные мутации хромосом X и Y занимают одно из ведущих мест в этиологии аномалий формирования пола, являясь распространенными причинами нарушения развития органов половой системы и ‘мажорными’ генетическими факторами тяжелых форм бесплодия, как у мужчин, так и у женщин, в первую очередь, связанных с гипогонадизмом, нарушением гаметогенеза.

Согласно полученным данным цитогенетического исследования, частота мутаций гоносом (в том числе аутосомно-гоносомных мутаций – 0,12%) у пациентов с нарушением формирования пола или репродуктивной функции

составила 4,51%. При этом частота прямо зависит от степени тяжести нарушения репродуктивной системы – наибольшая частота (15,3%) мутаций половых хромосом выявлена у пациентов с нарушением формирования пола (детей с нарушением физического и/или полового развития частота мутаций гоносом значительно превышала соответствующий показатель у взрослых пациентов с нарушением репродуктивной функции (3,1%). Превалирующими мутациями являлись мутации гоносом (87,2% от всех обнаруженных хромосомных мутаций), при этом преобладали числовые мутациями хромосомы X (75,2%), в большинстве случаев представленные у мужчин – синдромом Клайнфельтера, у женщин – Шерешевского-Тернера. В структуре цитогенетических вариантов СШТ регулярная моносомия X составила 43%, мозаицизм по хромосоме X – 20,4%, наличие в кариотипе Y-хромосомы или перестроенной X-хромосомы – 8,4% и 9,3%, соответственно. Молекулярно-цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование позволило выявить у 16,7% 45,X пациентов скрытый мозаицизм по хромосоме Y, происхождение маркерных хромосом (дериваты X и Y – 1:1), делеции гена *SRY* у 8% Y-позитивных больных с СШТ и 1,7% пациентов мужского пола с мозаицизмом X/Y, соответственно.

В отличие от пациентов с СШТ у мужчин, имеющих в кариотипе несбалансированные структурные перестройки Y-хромосомы и/или X/Y мозаицизм, маркерные хромосомы гоносомного происхождения представляют собой Y-дериваты. В данной группе пациентов выявлена наибольшая (63%) частота делеции длинного плеча Y-хромосомы. Среди них преобладали терминальные Yq и дицентрики Yp с точками разрыва в Yq11.22-23 (с делециями AZFc и/или AZFb регионов). Фенотип мужчин-мозаиков X/Y варьирует от «мягких» форм, характеризующихся умеренной гипоплазией гонад с проявлением или без первичного гипогонадизма, у взрослых – бесплодием из-за нарушения сперматогенеза (секреторной азооспермией или олигозооспермией тяжелой или среднетяжелой степени) до выраженного нарушения маскулинизации (гипоспадия, крипторхизм, гипоплазия гонад) и наличия признаков моносомии X: низкий или ниже среднего рост, аномалии скелета, дизморфии, характерные для синдрома Шерешевского-Тернера (ранее описанный как «мужской вариант» синдрома СШТ). Следует отметить, что при одностороннем нарушении развития яичек (монорхией)

мозаицизм и/или микроделеции региона AZFc Y-хромосомы обнаружены нами у 5 из 13 пациентов, при анорхизме мутации гоносом не выявлено.

Полученные данные свидетельствуют о том, что монорхизм представляет собой одну из форм синдрома тестикулярной дисгенезии, при этом для мозаицизма X/X_Y характерна асимметричность в поражении развития гонад. Так как наличие структурных и микроструктурных перестроек Y-хромосомы может предрасполагать к возникновению мозаицизма по Y, можно предположить, что, по крайней мере, у части пациентов с синдромом тестикулярной дисгенезии, имеющих микроделеции Y-хромосомы, но не имеющих явного мозаицизма (по данным цитогенетического исследования), могут иметь скрытый гоносомный мозаицизм, в частности в гонадах. В пользу этого свидетельствует обнаружение микроделеций у пациентов мозаиков по Y с наличием клона 45,X (мозаицизм X/X_Y и его варианты) с одной стороны, а с другой – случаи выявления скрытого низкоуровневого мозаицизма у пациентов-носителей микроделеций Y-хромосомы. Высоким значением (45,5%) частоты AZFc делеций у пациентов с гоносомным мозаицизмом с наличием ди-/полисомий Y, что также свидетельствует в пользу митотической нестабильности перестроенной Y-хромосомы.

В отличие от вышеуказанного гоносомного мозаицизма у пациентов с 46,XX/46,X_Y мозаицизм и химеризм не показана повышенная частота микроделеций длинного плеча Y-хромосомы. Следует особо отметить высокую частоту (20%) ошибок (ложноположительной и ложноотрицательная диагностики) в определении данной аномалии гоносом при использовании только стандартного цитогенетического анализа.

Применение молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического исследования позволило подтвердить/исключить случаи данной гоносомной аномалии, выявить химеризм (в 2 из 5 случаев) или скрытый мозаицизм по хромосоме Y, обнаружить делеция гена *SRY* выявлена у 6,3% XX/X_Y пациентов. Спектр фенотипов развития половой системы обследованных нами пациентов с кариотипом 46,XX/46,X_Y варьировал от мужского, двойственного до женского. При этом соотношение мужского, двойственного и женского развития гениталий равнялось 6:6:4.

Для полных форм дисгенезии гонад при кариотипах 46,XX и 46,XY характерно наличие женского фенотипа без признаков двойственности развития. Данные аномалии формирования пола могут быть обусловлены как аутосомными, так и гоносомными мутациями. Согласно полученным данным, частота делеции гена *SRY* у пациентов с полной формой XY-дисгенезией гонад составила 10,8%, что согласуется с данными других исследователей. В редких исследованных нами случаях XY-дисгенезия сочеталась со скрытым гоносомным мозаицизмом и/или перестройками Y, в частности изодицентрическими Y-хромосомами (по результатам повторного цитогенетического или молекулярно-цитогенетического исследования).

В большинстве случаев отсутствие последовательности гена *SRY* и наличие локуса *AMELY* (Yp11.2) у XY-индивидуумов свидетельствует о потере дистальной части Yp11 вследствие ее замещения дистальной частью Xp22 на дериватной Y-хромосоме в результате Xp;Yp транслокации. При комплексном генетическом обследовании пациентов с XX-дисгенезией гонад в 32% случаев обнаружены гоносомные мутации, представленные скрытым мозаицизмом по хромосоме X или Y, структурными перестройками хромосомы X, скрытой X-Y транслокацией. Интригует, что среди выявленных случаев структурных аномалий X-хромосомы, в том числе скрытой транслокации материала Yp11 на длинное плечо хромосомы X, точки разрыва располагались вблизи, а возможно и в XTR-регионе хромосомы X (Xq21.3-q22). В последнем случае выявленный генотип характерен для *SRY+* XX-инверсии пола. Согласно полученным данным частота ее частота у мужчин без Y-хромосомы в кариотипе составила 82%. Наличие гена *SRY* обнаружено у 84% пациентов с XX-инверсией пола/тестикулярной формой НФП, в 82% случаев обусловленной ее транслокационной (Yp+) формой, и только в 2% – скрытым мозаицизмом по хромосоме Y. Несмотря на структурную перестройку в области нормальной X-Y рекомбинации (PAR1 регион), для *SRY-* пациентов с XY-дисгенезией гонад вследствие X-Y транслокации не характерен гоносомный мозаицизм с клоном 45,X (с потерянной Y-хромосомой). Выявленный случай X/XY мозаицизма у обследованных нами пациенток с XY-дисгенезией гонад был обусловлен наличием другого типа перестройки хромосомы Y – изодитетрика по длинному плечу с точка разрыва в Yp11.2 и потерей гена *SRY*. В результате этого у

пациентки была целиком утрачен регион PAR1. Так как изодицентрические хромосомы Y часто нестабильны, наличие мозаицизма X/X, idicYq, очевидно является результатом митотической нестабильности изодицентрика на стадиях деления дробления у эмбриона.

У другой SRY-негативной пациентки с XY-дисгенезией гонад с очень редким для женщин кариотипом (47,XXY) аномалия гоносом возникла в результате сочетания мутаций половых хромосом: X-Y транслокации и не расхождения гоносом. Выявленный низкоуровневый мозаицизм по эуплоидному клону (46,XY), очевидно был обусловлен постзиготической потерей одной из двух хромосом X в части клеток, что привело к возникновению минорного клона.

В отличие от них у SRY+ пациентов с XX-инверсией пола, неожиданным являлось обнаружение нами мозаицизма по хромосоме X, в том числе сложного мозаицизма по дериватной SRY-несущей хромосоме X. Поскольку количество (%) клеток, имеющих в кариотипе Y-хромосому/несущих ген SRY является одним из определяющих факторов для дифференцировки гонад по мужскому типу, то у пациентов с XX-инверсией пола, имеющих подобный мозаицизм может являться одним из факторов фенотипической вариабельности маскулинизации.

Неполная маскулинизация выявлена у 28% больных с XX-инверсией пола/синдромом, при этом отмечена в 1,75 раза чаще у SRY- 46,XX-мужчина мужчин, чем SRY+ 46,XX-мужчина. При комплексном анализе гоносом пациентов с овотестикулярной формой нарушения формирования пола наличие гена SRY и Y-хромосомы в кариотипе обнаружено в 25% случаев (46,XY, химеризм XX/XY, мозаицизм по SRY+ isoYr изохромосоме). Выявлена возможность различных клинических форм нарушения дифференцировки гонад у сибсов (SRY- 46,XX тестикулярная и овотестикулярная форма нарушения формирования пола). Мутации гена SOX3 (в результате дупликации и транслокации которого на хромосому Y произошел ген SRY) не обнаружены нами у пациентов, имеющих 46,XX-тестикулярную или овотестикулярную форму нарушения формирования пола, в том числе SRY-негативных пациентов. Что свидетельствует, что его делеции и мутации кодирующей области гена SOX не характерны для XX-инверсии пола.

Наиболее частой причиной развития тестикулярной ткани у пациентов с XX-инверсией пола/синдромом «46,XX-мужчина» является транслокация материала короткого плеча Y-хромосомы с геном *SRY*, как правило, на короткое плечо хромосомы X. В 9 из 10 мужчин без цитогенетически идентифицируемого материала Y-хромосомы в кариотипе, мы выявили данную микроструктурную перестройку гоносом, в одном случае выявлена транслокация фрагмента Yp11 на короткое плечо хромосомы 22.

С помощью картирования точек разрыва нами установлено расположение точек разрыва и размер сохраненного участка короткого плеча Y-хромосомы, согласно которому все *SRY*+/*Yp*+ пациенты с XX-инверсией пола могут быть классифицированы на 3 класса (в делеционных интервалах 1, 2 и 3): первый (15%), второй (n=17,5%) и третий (67,5%). Таки образом примерно у 2/3 *SRY*+ 46,XX-мужчин скрытая транслокация аномальная X-Y рекомбинация при этом точки разрыва располагались в 3-ем делеционном интервале в области локализации гена *PRKY*, что характерно для многих X-Y транслокаций при *SRY*+ XX-инверсии пола и некоторых случаях *SRY*- XY-дисгенезии гонад. Хотя ранее было показано, что для возникновения X-Y рекомбинации в гомологичных генах *PRKX/PRKY* требуется наличие в коротком плече хромосомы Y парацентрической инверсии, фланкированной потрами *IR3*, в 1 из 27 случаев *Yp*+ XX-инверсии пола аномальная X-Y рекомбинация возникла при отсутствии *IR3* инверсии.

Результаты молекулярного анализа последовательностей Y-хромосомы также свидетельствовали о расположении точек разрыва в области XTR в гене *PCDH11Y* у 7 пацентов с XX-инверсией пола и пациентки с *SRY*-позитивной НФП, имевшей скрытую транслокацию материала Yp11 на длинное плечо хромосомы X в область локализации XTR региона, где располагается ген *PCDH11X*.

Схожесть локализации точек разрыва при X-Y транслокациях, терминальных делециях X и Y свидетельствует об общности механизмов их возникновения в мейозе у мужчин. В рисунках Приложения 7-10 приведены схемы X-Y рекомбинации между различными гомологичными областями хромосом X и Y, а также продукты рекомбинации (несбалансированные перестройки половых хромосом). Ряд гоносомных аноалий, приведенных в них, описан в литературе, однако некоторые не были описаны в научной литературе. Следует отметить, что

частота встречаемости альтернативных продуктов рекомбинации не является равной, что свидетельствует о особенностях механизмов образования данных продуктов аномальной генетической рекомбинации, возможного влияния их негативного отбора.

Полученные результаты данной работы, а также многочисленные данные других исследований половых хромосом человека и их мутаций свидетельствуют, что механизмы образования гоносомных аномалий в значительной степени обусловлены «тонкой» структурой половых хромосом человека, сложившейся в процессе эволюции млекопитающих и определяющей особенности их генетической рекомбинации. Причиной не только микроделечий, микродупликаций и инверсий, но и дицентрических хромосом X и Y, X-Y транслокаций, а также некоторых терминальных делеций гоносом является неаллель гомологичная рекомбинация (NAHR), в том числе гомологичных областях разных хроматид и хромосом (X и Y). Рекомбинация между гомологичными регионами (палиндромами) Y-хромосомы является причиной большинства AZFb, AZFb+c и AZFc микроделечий, а также дицентрических хромосом Yp, в регионах; рекомбинация в пределах PAR1 региона Y-хромосомы – к образованию Yq дицентриков.

Комплексный цитогенетический и молекулярно-генетический анализ позволил оценить частоту и спектр структурных аномалий Y-хромосомы на выборке из 8,2 тыс мужчин с бесплодием. Полученные данные свидетельствуют о превалировании частоты структурных перестроек Y-хромосомы над числовыми мутациями половых хромосом. Если по данным стандартного цитогенетического исследования большинство хромосомных мутаций у мужчин с аномалие формирования пола/бесплодием связано с анеусомией хромосомы X, то данные молекулярно-генетического исследования свидетельствуют, что наибольшую частоту микроделечии AZF локуса (если учитывать частичные делеции региона AZFc - 16%). У пациентов с синдромом Клайнфельтера микроделечии AZFc обнаружены в 15% случаев; с дисомией и полисомией Y – 45,5%; с аутосомно-гоносомными транслокациями в 16,7%; сбалансированными перестройками аутосом/Yхромосомы 23,3%; с гетероморфизмом Y хромосомы или подозрением на наличие Yq делеций – 47%. Практически все изодицентрические хромосомы по короткому плечу связаны с делецией регионов AZFb и AZFc.

Результаты, полученные при анализе состояния сперматогенеза и мейоза у мужчин с различными аномалиями гоносом, свидетельствуют о прямой зависимости степени нарушения деления и созревания мужских половых клеток от тяжести мутаций половых хромосом в кариотипе их носителей.

У пациентов с сохранением/частичным сохранением, имеющих в кариотипе анеусомию по хромосоме X или Y, цитогенетические или микроструктурные перестройки Y выявлено значимое (от 3-х до 13-кратного) увеличение частоты анеуплоидии по гоносомам и аутосомам (13, 18 и 21) в сперматозоидах. Наибольшая частота анеуплоидий по гоносомам выявлена при синдроме Клайнфельтера, а также гоносомно-аутосомных транслокации (за исключением транслокации гетерохроматина Yqh), а для аутосом – при полной AZFc (b2/b4) делеции.

Результаты проведенного исследования, в том числе описанные клинические случаи, наглядно свидетельствуют, что для многих синдромов и состояний, связанных с аномалиями половых хромосом, характерно многообразие клинических форм – выраженный фенотипический полиморфизм. Это обусловлено с одной стороны – генетической гетерогенностью самих синдромов, связанных с аномалиями половых хромосом (их числовыми, структурными и микроструктурными мутациями мозаицизмом или химеризмом) и нарушений формирования пола, а с другой стороны – их клинической вариабельностью, частичной перекрываемостью их цитогенетических вариантов и схожестью фенотипических (клинических) проявлений. На рисунках 11-16 приведены континуумы генитальных фенотипов у пациентов с различными аномалиями половых хромосом (мозаицизм по хромосомам X и Y, кариотипе кариотипе 46,XX/46,XY и мозаицизме X/XY, генотипе SRY+ XX), созданные по результатам собственных исследований и многочисленных литературных данных.

Так, фенотип пациентов женского пола в зависимости мозаицизма X/XX от может варьировать от синдрома СШТ, полной или неполной формы XX-дисгенезии гонад, СПНЯ, нарушения менструального цикла с наличием или отсутствием бесплодия, до фенотипически нормальных женщин с сохраненной репродуктивной функцией (рис. 12 Приложение 22).

Пациенты мужского пола с регулярной формой дисомии X имеют «классический» немозаичный синдром Клайнфельтера. При мозаицизме XY/XY фенотип варьирует от характерного для синдрома Клайнфельтера, его стертых («мягких») форм до мужчин с бесплодием и даже фертильных мужчин с гоносомным мозаицизмом низкоуровневым клоном клеток 47,XXY (рис. 13 Приложение 23).

Ярким примером выраженного клинического полиморфизма является X/XY мозаицизм, фенотипический спектр которого простирается от СШТ без признаков вирилизации, смешанной дисгенезии гонад, овотестикулярной формы НФП, тестикулярной дисгенезии с различной степенью дефицита маскулинизации до мужчин без НФП, имеющих бесплодие вследствие нарушения сперматогенеза (рис. 14 Приложение 24).

Степень нарушения формирования по мужскому полу при этом в первую очередь определяется процентной выраженностью мозаицизма по половым хромосомам в дифференцирующихся развивающихся гонадах, а также сохранностью функции генов (как X-, Y-сцепленных, так и аутосомных), контролирующих дифференцировку пола, в частности мажорного фактора, детерминирующего мужской пол – гена *SRY*. В выборке из 71 X/XY мозаика, имеющих мужской (n=36) или женский (n=35) пол, не выявлено значимого различия по среднему значению количества Y-позитивных клеток в лимфоцитах периферической крови ($70,6 \pm 20,9\%$ и $61,6 \pm 22,2\%$, соответственно). Вероятно это обусловлена отличным от клеток крови соотношением клонов по набору половых хромосом в других тканях, в частности в гонадах.

В отличие от X/XY мозаиков при анализе гено-фенотипических корреляций в группах пациентов с мозаицизмом/химеризмом XX/XY выявлена прямая зависимость степени маскулинизации от количества Y-позитивных клеток. При количестве Y-несущих клеток более 30%, у них отмечена выраженная или нормальная маскулинизация (рис. 15 Приложение 25).

Для *SRY+* пациентов с XX-инверсией пола/XX тестикулярной формой НФП характерно наличие 46,XX кариотипа, однако согласно нашим данным, примерно в 10% могут быть кариотипы с 1 хромосомой X (*SRY+* 45,X-мужчины) или мозаицизмом по хромосоме X с наличием клонов, несущих 1-3 X-хромосомы.

Кроме того в научной литературе описаны случаи генотипов *SRY+ 45,X/46,XX* и *SRY+ 46,XX* у пациентов с дисгенезией гонад/СШТ, XX-инверсией пола и овотестикулярной формой НФП, а также *SRY+ 47,XXX*-мужчин (рис. 16 и 17 Приложение 26 и 27, соответственно).

Наличие и выраженность мозаицизма по половым хромосомам, наличие структурных (их цитогенетически идентифицируемых или микроструктурных) перестроек, точковых мутаций генов, вовлеченных в дифференцировку гонад и морфогенез половой систем эпигенетические нарушения, влияет на процессы клеток гонад и может являться дополнительным, а в ряде случаев – определяющим, генетические и фенотипические последствия фактором. Поэтому гоносомный мозаицизм является одним из ключевых проблемных факторов, обуславливающих сложность в определении гено-фенотипических корреляций у пациентов с нарушения репродукции, имеющих мутации в системе половых хромосом.

Алгоритмы цитогенетического и молекулярно-генетического обследования пациентов с нарушением формирования пола.

На основе результатов собственных исследований, разработанных ранее в лаборатории схем обследования пациентов с нарушением репродуктивной функции [Курилоб 1997], а также диссертационных работ по изучению половых хромосом гоносомнообсловленны синдромов и нарушений формирования пола других авторов [Осипова, 1997; Вяткина, 2003], нами разработаны алгоритмы генетического цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического обследования пациентов с различными формами нарушения формирования пола и/или репродуктивной функции.

На рисунках 73-78 приведены алгоритмы лабораторно-генетического обследования для 6 форм НФП, которые могут быть связаны с (Y+)аномалиями половых хромосом: синдром Шерешевского-Тернера (СШТ), синдром Клайнфельтера, XX- и XY-дисгенезия гонад, овотестикулярная форма НФП (истинный гермафродитизм) и 46,XX-тестикулярной формой НФП (синдром '46,XX-мужчина'). Приведенные алгоритмы описывают общую последовательность проведения генетической диагностики/обследования: стандартное цитогенетическое (анализ кариотипа по лимфоцитам периферической крови), молекулярно-цитогенетическое (интерфазный и метафазный FISH анализ на

лимфоцитах периферической крови и других соматических клетках) и молекулярно-генетическое исследование (ПЦР и ее модификации, мультиплексный ПЦР, гнездная ПЦР, КФ-ПЦР). Важно отметить, что в зависимости от каждого конкретного клинического случая схема обследования может претерпевать некоторые изменения, например, с внесением некоторых видов генетического исследования не указанных на данных схемах. Так, для исследования половых хромосом могут быть использованы и другие методы молекулярного анализа: количественная флюоресцентная ПЦР (КФ-ПЦР) сравнительная, такие как геномная гибридизация, агау CGH (микроматричный анализ хромосом), MLPA анализ, секвенирование ДНК и другие методы. В таблице 12 Приложения 29 описаны возможности различных цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов в диагностике мутаций половых хромосом. Использование преимуществ каждого метода позволяет повысить эффективность генетического исследования.

Для пациентов с нарушением формирования пола часто определяющим фактором является кариотип. Набор половых хромосом и наличие или отсутствие нарушений в них положен во главу современной классификации НФП, предложенной в 2006г. Консенсусом по аномалиям полового развития [Lee et al., 2006]. Поэтому стандартное цитогенетическое исследование является первым, а в ряде случаев единственным этапом в диагностике большинства аномалий пола.

В случаях обнаружения специфичных аномалий половых хромосом, например при синдромах Шерешевского-Тернера и Клайнфельтера, и при других типах анеуплоидии по гоносомам, диагностика не представляет каких-либо трудностей и диагноз может быть поставлен уже по результатам стандартного цитогенетического обследования. Однако в ряде случаев даже хорошо изученных заболеваний требуется проведение дополнительного молекулярно-цитогенетического и/или молекулярно-генетического обследования. Это позволяет уточнить (а иногда и правильно оценить) кариотип, тип гоносомной аномалии, точки разрыва, наличие/отсутствие Y-хромосомы или ее фрагментов, в частности гена *SRY*, наличие, тип и уровень гоносомного мозаицизма, детектировать микроструктурные и генные мутации, родительское происхождение хромосом и мутаций, выявить однородительскую дисомию (ОРД), оценить характер инактивации хромосомы X и

другие генетические факторы. Например, исследование последовательностей Y-хромосомы с помощью FISH анализа или молекулярных методов позволяет быстро и эффективно установить происхождение маркерных хромосом. Для таких нарушений аномалий полового развития как, синдром Шерешевского-Тернера, синдром '46,XX-мужчина', овотестикулярная форма НФП, для различных форм дисгенезии гонад, анализ гена *SRY* занимает важное место в генетическом обследовании. В таблице 57 приведены показания для детекции гена *SRY* и анализа его точковых мутаций.

Определение генетического пола (не только по набору половых хромосом, но и по генам, контролирующим развитие половой системы), выявление его нарушений имеет решающее значение в диагностике аномалий формирования пола и тактики ведения и лечения пациента (выбора, коррекции пола, удаления дисгенетичных гонад и т.д.).

Одной из задач дополнительного генетического обследования (ДНК- и FISH-анализ) является выявление скрытого мозаицизма по половым хромосомам, оценка его типа и уровня в лимфоцитах периферической крови, в других типах клеток. Это исследование особенно актуально для больных пациентов, с различными Y-негативными (по данным стандартного цитогенетического исследования) формами нарушений дифференцировки и развития гонад, а также у пациентов с СШТ, в частности с регулярной формой моносомии X, у которых при анализе кариотипа не было обнаружено наличия Y-хромосомы или ее материала.

У тех мужчин с аномалиями формирования пола, у которых частично сохранен сперматогенез и имеется достаточное количество половых клеток для выполнения FISH-анализа (в том числе с синдромом Клайнфельтера, мозаицизм омпго гоносомам, структурными перестройками хромосом X, Y), возможно определение уровня анеуплоидии по половым хромосомам и аутосомам. Так как ее частота является важным фактором в репродуктивном прогнозе (успешности проведения программ ЭКО, ICSI и наступления беременности), а также в оценке генетического риска хромосомных мутаций у потомства и необходимости проведения ПГД.

Так как для ряда форм нарушения дифференцировки гонад характерны выраженная генетическая гетерогенность и они могут быть вызваны не только количественными, структурными аномалиями гоносом или X- и Y-сцепленными

генными мутациями, но и аутосомными микроструктурными перестройками и точковыми мутациями генов, контролирующих дифференцировку и развитие гонад, мы сочли необходимым внести в схему обследования проведение соответствующих исследований в случае исключения мажорных генетических мутаций (как правило затрагивающих гоносомы), в случае отсутствия обнаружения количественных и структурных мутаций половых хромосом, а также гена *SRY*. Исследование наличия/отсутствия локусов *SRY*, *AMELX/Y* и *AZF* зачастую позволяет определить аномалию гоносом, дальнейшую тактику обследования (Табл. 13 Приложение 30).

Следует также отметить, что в редких случаях НФП при стандартном цитогенетическом исследовании в кариотипе обнаруживают структурные перестройки не только гоносом, но и аутосом, которые могут затрагивать локусы, вовлеченные в генетический контроль дифференцировки гонад. Очевидно, что и микроструктурные перестройки, с высокой эффективностью детектируемые с помощью микроматричного анализа хромосом (array CGH), могут быть причиной развития некоторых форм НФП. Однако пока данный метод, также как и секвенирование генома или экзона, пока не получили широкого применения в диагностике генетических нарушений формирования пола. Поэтому необходимо внедрение и широкое использование высокоразрешающих методов анализа генома при генетически гетерогенных нарушениях полового развития, особенно в случаях, когда при широко используемых методах цитогенетической и молекулярной диагностики не выявлено причин их возникновения.

Приведенные выше клинические случаи наглядно демонстрируют, что использование комбинации нескольких различных методов цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического обследования повышает эффективность и точность детекции гоносомных аномалий у пациентов с нарушением формирования пола и бесплодием. Взаимно дополняя и верифицируя (контролируя) друг друга, они наиболее эффективны при сложных клинических случаях, таких как химеризм XX/XY, при некоторых типах мозаицизма, сложных структурных перестройках гоносом, как например, X-Y транслокации, дицентрические хромосомы, при несоответствии результатов первичного и повторного кариотипирования, результатов цитогенетического и молекулярного исследования.

Многообразие типов мутаций у пациентов с нарушением репродукции затрудняют проведение их генетической диагностики. У большинства пациентов, имеющих синдромальные формы, связанные с мутациями половых хромосом, диагностика не является затруднительной. Однако в ряде случаев нарушения формирования пола, полового развития и пациентов с бесплодием наиболее эффективным подходом в исследовании многих мутаций гоносом является комплексное (цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического) исследование. Проведение подобного генетического анализа, в том числе исследуя различные по происхождению ткани (кровь, буккальный эпителий, материал биоптатов), позволяет выявить/исключить наличие, оценить выраженность мозаицизма, а молекулярно-генетического исследования – выявить наличие химеризма или гоносомного мозаицизма. Результаты различным методов анализа мутаций половых хромосом, зачастую дополняют друг друга, позволяя оценить геном на всех его уровнях (хромосомный, генный, эпигенетический). Проведение комплексного (клинико-генетического, цитогенетического, молекулярно-генетического и молекулярно-генетического) обследования позволяет повысить эффективность медико-генетического обследования и консультирования у пациентов с нарушением репродуктивной системы.

Рисунок 73. Алгоритм медико-генетического обследования пациентов с синдромом Шерешевского-Тернера (СШТ).

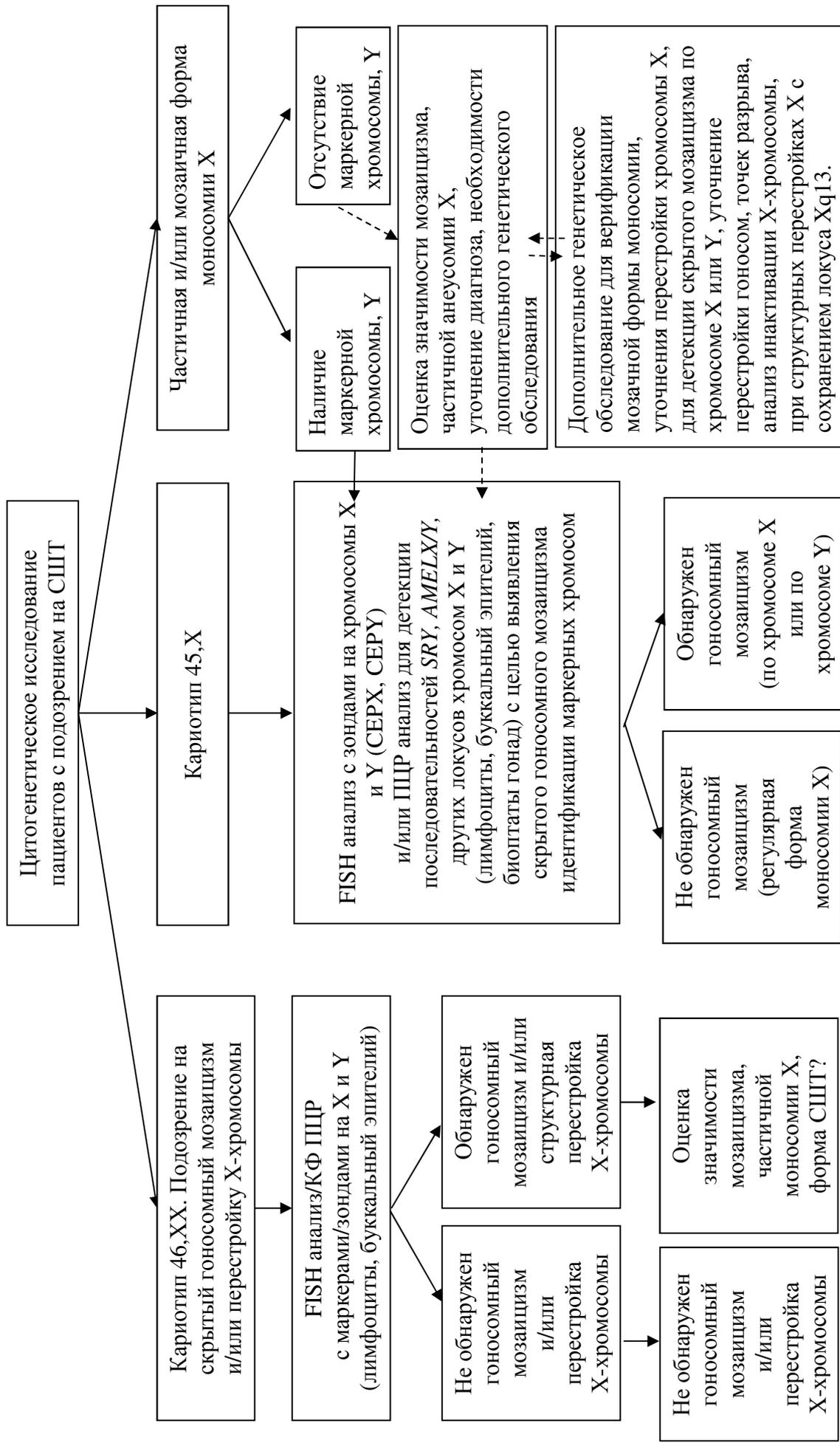


Рисунок 74. Алгоритм медико-генетического обследования пациентов с синдромом Клайнфельтера (СК).

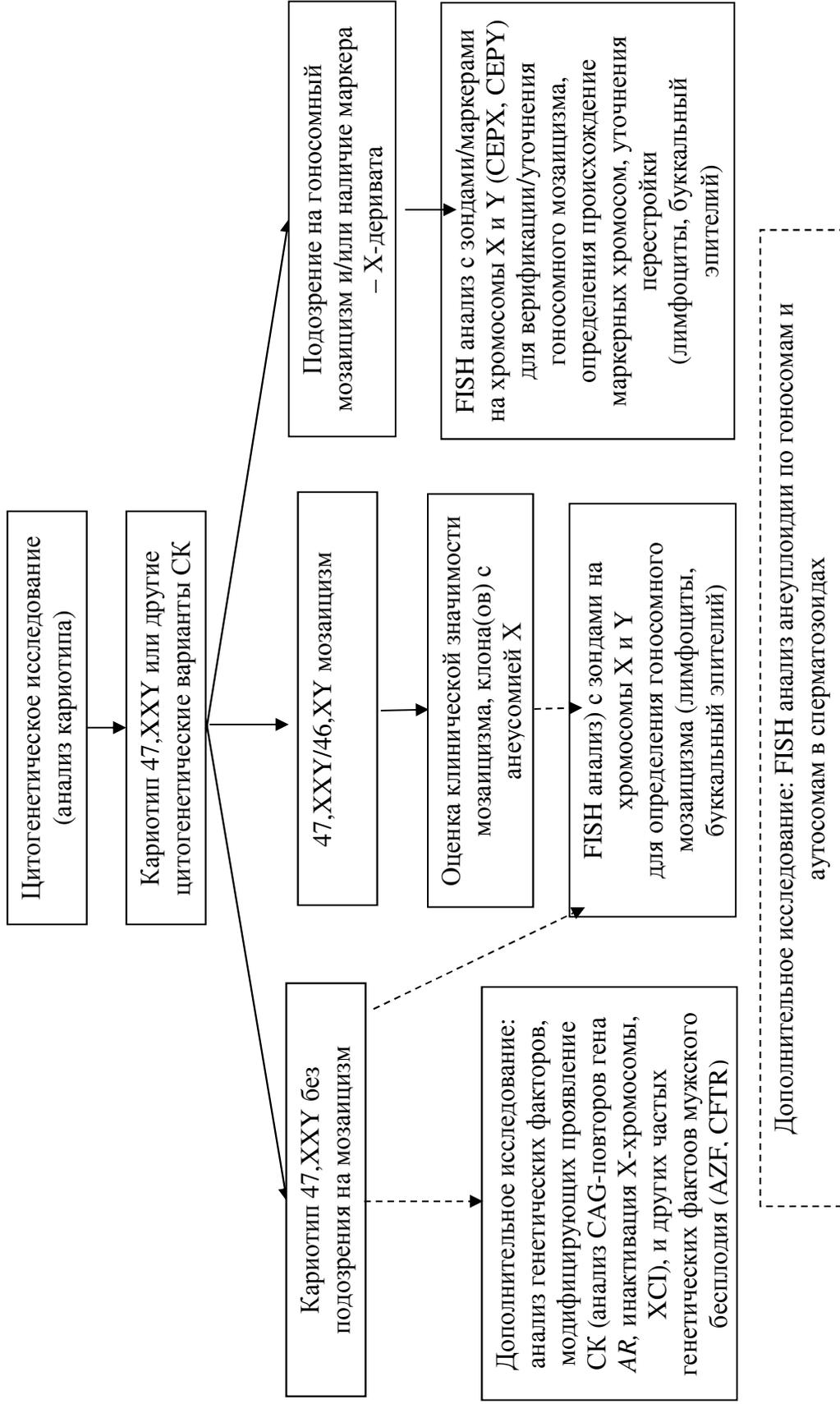


Рисунок 75. Алгоритм медико-генетического обследования пациентов с дисгенезией гонад при кариотипе 46,XX.

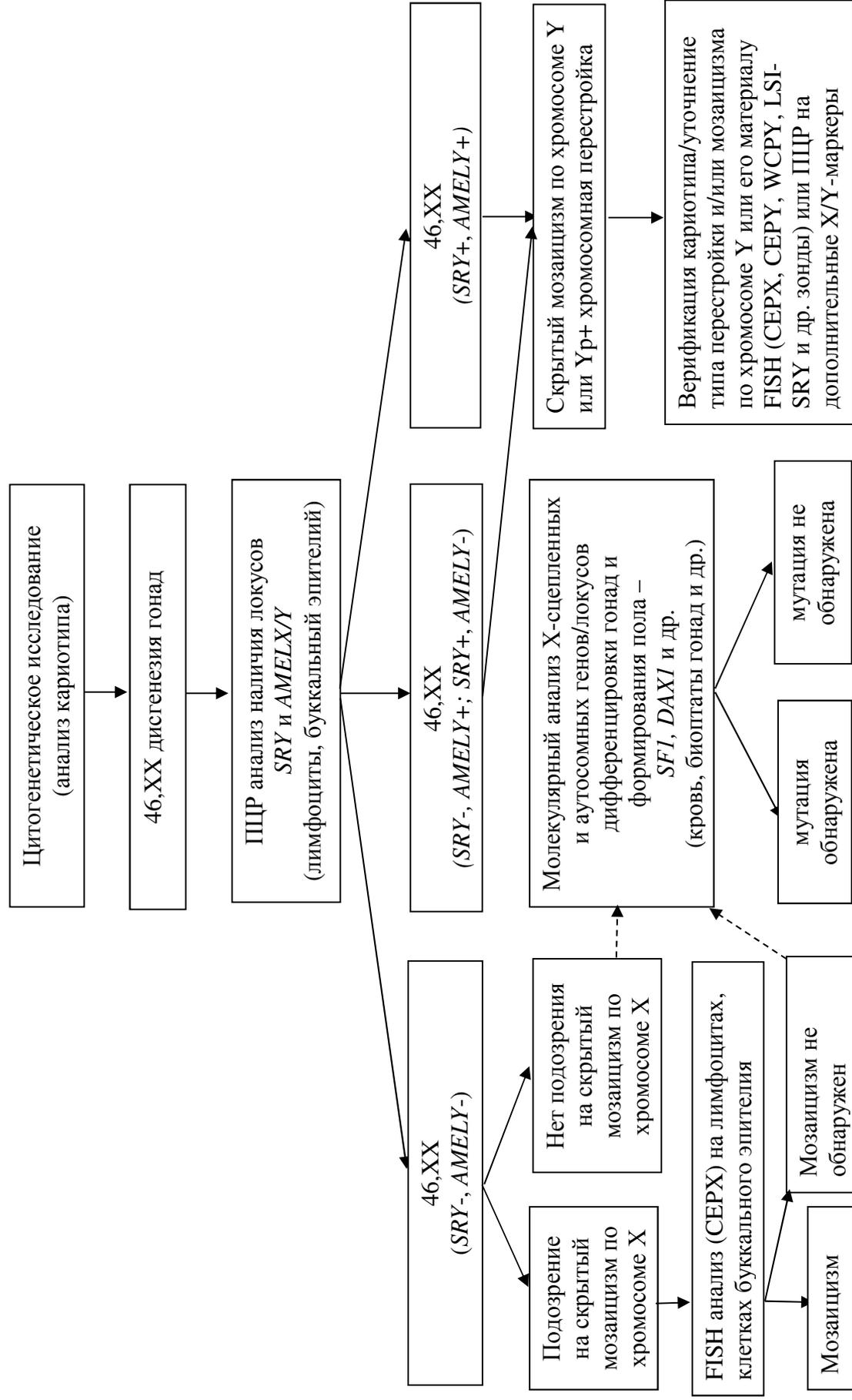


Рисунок 76. Алгоритм медико-генетического обследования пациентов с дисгенезией гонад при кариотипе 46,XY.

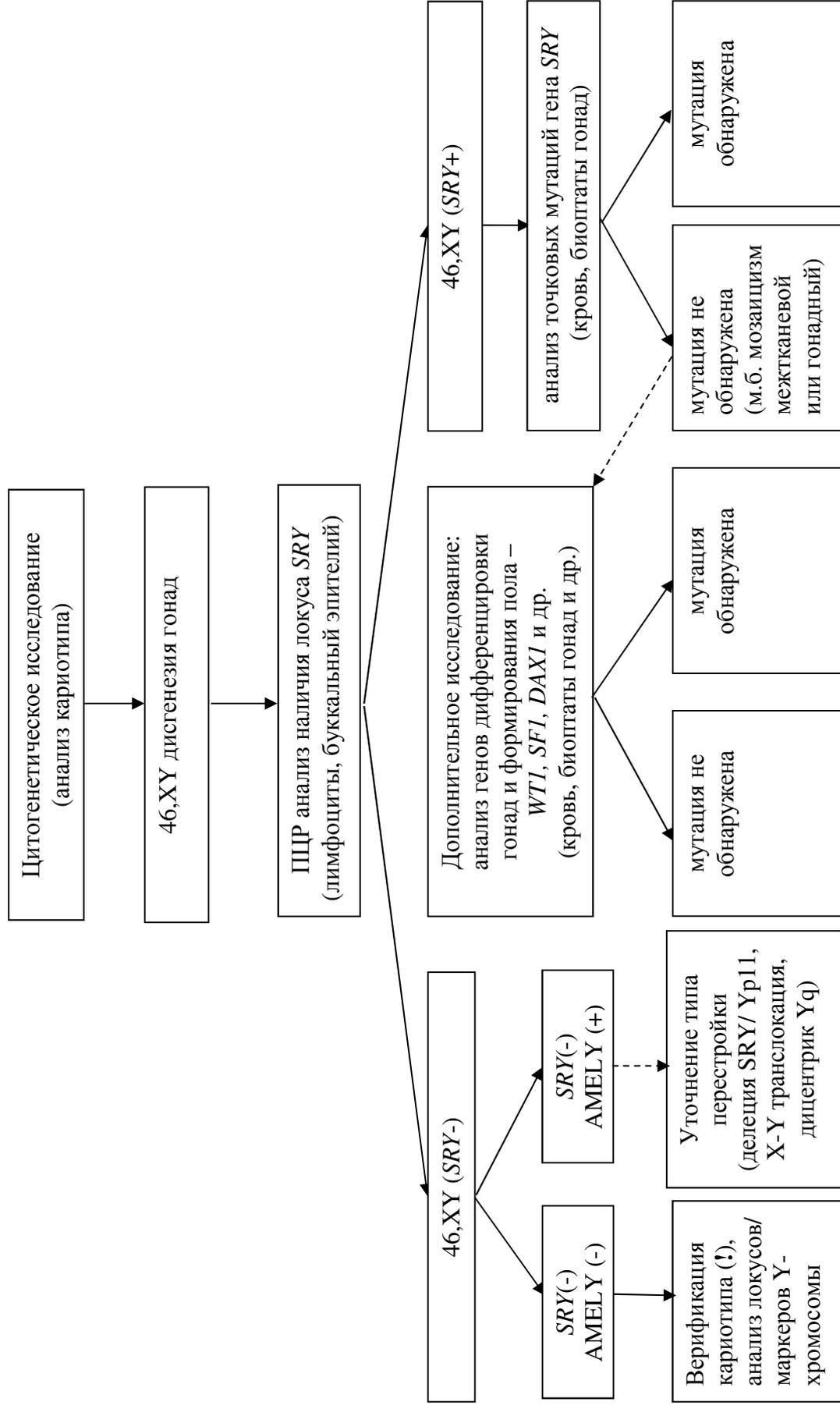


Рисунок 77. Алгоритм медико-генетического обследования пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП.

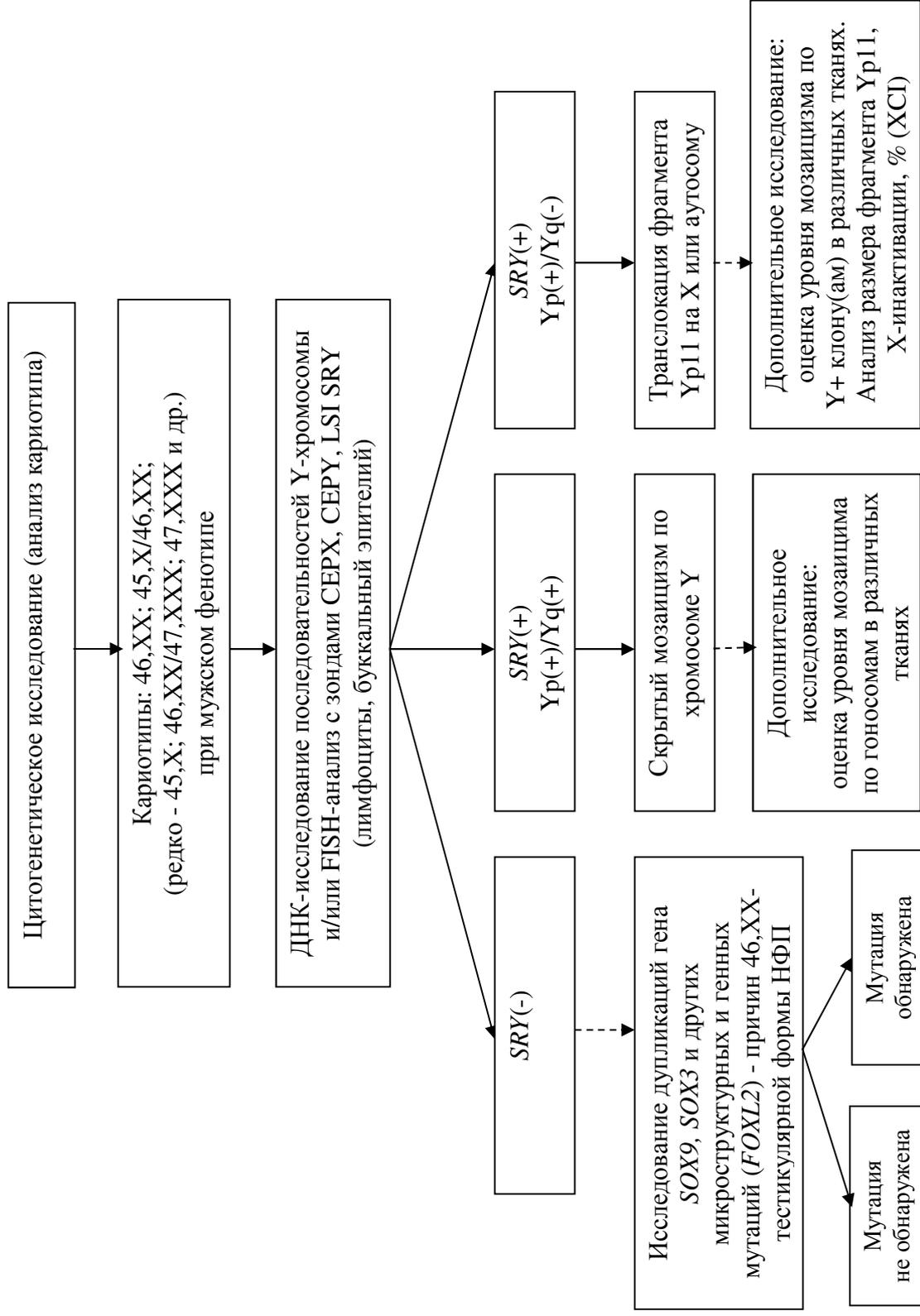
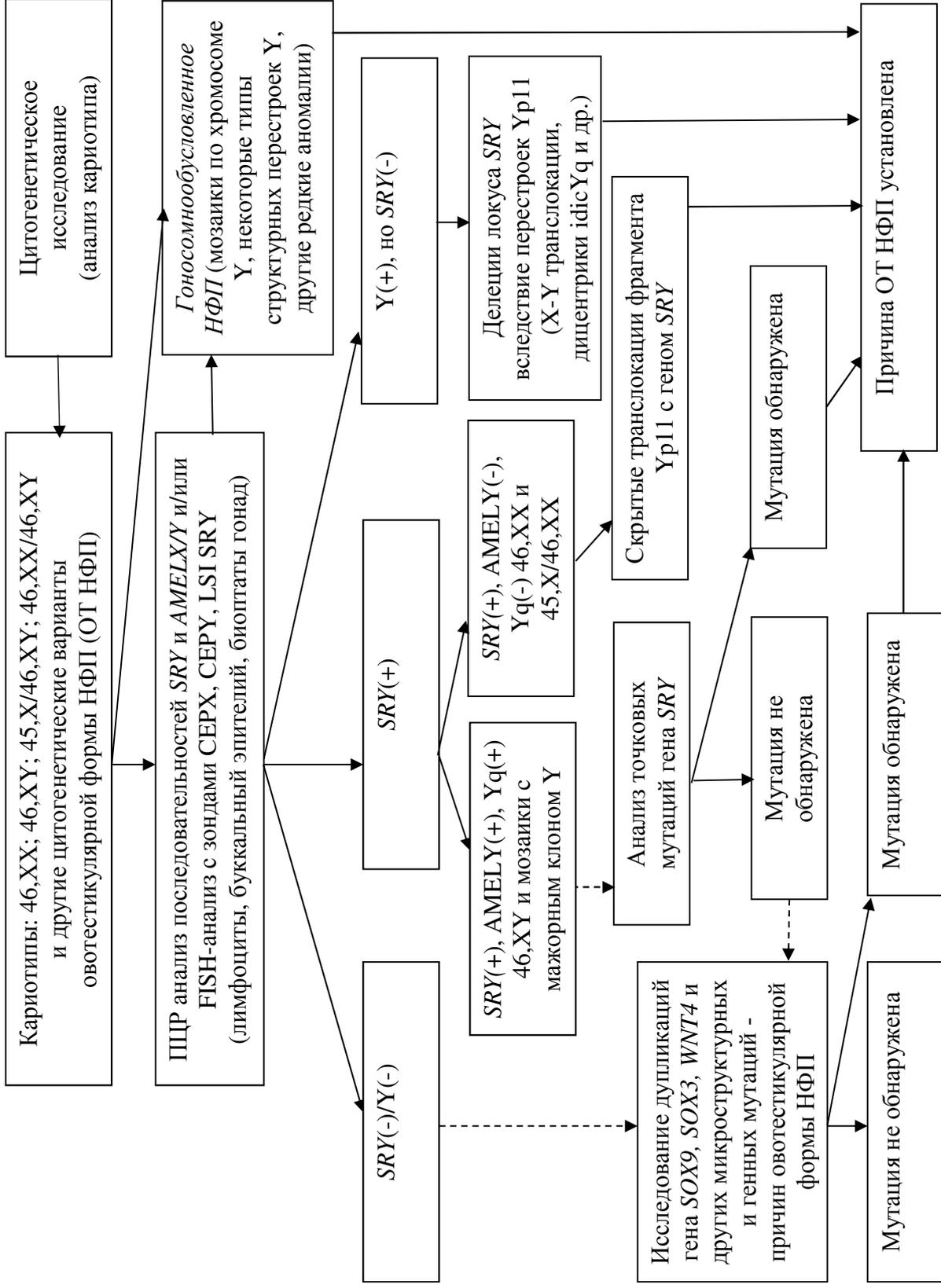


Рисунок 78. Алгоритм медико-генетического обследования пациентов с овотестикулярной формой НФП.



Виды исследования гена *SRY* и показания для молекулярно-генетического исследования при нарушениях формирования пола, НФП.

Анализ наличия гена <i>SRY</i>	Анализ мутаций в гене <i>SRY</i>
НФП с наличием в кариотипе хромосомы Y:	
<ul style="list-style-type: none"> • Дисгенезия гонад при кариотипе 46,XY полная форма (синдром Свайера). • Овотестикулярная форма НФП при кариотипе 46,XY. • Мозаицизм по Y-хромосоме: • 45,X/46,XY и его варианты • 46,XX/46,XY. • Структурные перестройки Y-хромосомы (r(Y), isoYp, idicYp, idicYq и другие). 	<ul style="list-style-type: none"> • Дисгенезия гонад при кариотипе 46,XY полная форма (синдром Свайера). • Овотестикулярная форма НФП при кариотипе 46,XY. • Синдром тестикулярной дисгенезии при нормальном мужском кариотипе (46,XY). • Синдром Шерешевского-Тернера с мозаицизмом по хромосоме Y.
НФП при отсутствии в кариотипе хромосомы Y:	
<ul style="list-style-type: none"> • Овотестикулярная форма НФП при кариотипе 46,XX. • Тестикулярная форма НФП при кариотипе 46,XX (синдром XX-мужчина). • Синдром Шерешевского-Тернера при кариотипах: • 45,X • 45,X/46,mar • 46,X,mar • другие варианты кариотипа с маркером (предположительно гоносомного происхождения). 	Не проводится.

Метод КФ-ПЦР может быть использован для молекулярного анализа следующих аномалий половых хромосом (гоносом):

1. Численных аномалий (анеусомий) гоносом:
 - синдрома Клайнфельтера;
 - синдрома Шерешевского- Тернера;
 - дисомии Y (47,XY₂);
 - трисомии X;
 - полисомий по половым хромосомам.
 2. Структурных гоносомных аномалий - несбалансированных перестроек с вовлечением материала хромосом(ы) X и/или Y:
 - делеции;
 - дупликации;
 - кольцевые хромосомы;
 - изохромосомы;
 - дицентрические и маркерные хромосомы;
 - X-X транслокации;
 - X-Y транслокации;
 - несбалансированные X-аутосомные и Y-аутосомные транслокации.
- Детекция и верификация мозаицизма по половым хромосомам (с долей минорного клона >15-20%).
 - Детекция химеризма при мозаицизме по гоносомам, например, при кариотипе 46,XX/46,XY.
 - Диагностика XX- и XY-инверсии пола (синдром 46,XX-мужчина, XY-дисгенезия гонад).
 - Анализ родительского происхождения X-хромосом (например, при синдроме Клайнфельтера, трисомии X).
 - Исследование характера инактивации (лайонизации) хромосомы X.

В ряде случаев диагностики аномалий гоносом КФ-ПЦР может быть использована только в сочетании с цитогенетическим и/или молекулярно-цитогенетическим исследованием!

Показания для проведения FISH анализа при мутациях половых хромосом или хромосомных аномалиях с вовлечением их материала.

1. Наличие в кариотипе маркерной(ых) хромосом (для определения их происхождения).
2. Верификация кариотипа (анеусомии, типа структурной перестройки, мозаицизма).
3. Определение/уточнение % мозаицизма, в том числе в разных тканях (лимфоциты периферической крови, буккальный эпителий, фибробласты кожи, клетки биоптатов гонад).
4. Подозрение на наличие скрытого гоносомного мозаицизма.
5. Детекция микроструктурных перестроек гоносом (аутосомно-гоносомных транслокаций, микроделеций, микродупликаций, инверсий и др.).

Рекомендации по молекулярному анализу микроделеций Y-хромосомы.

Анализ микроделеций Y-хромосомы показан мужчинам с бесплодием, у которых концентрация сперматозоидов составляет 5 млн./мл и менее (т.е. азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени). Пациентам, у которых диагностирована обструктивная форма азооспермии, либо другие явные причины мужского бесплодия с тяжелым нарушением сперматогенеза, например, синдром Клайнфельтера, синдром «46,XX мужчина», гипогонадотропный гипогонадизм, некоторые типы хромосомных перестроек (например, X-аутосомные транслокации), анорхизм, гонадэктомия, перенесенный эпидемический орхит, выполнение анализа не обязательно или не показано. Однако в некоторых случаях, в частности при сохранности в кариотипе материала длинного плеча Y-хромосомы, и наличии тестикулярной ткани и возможности получения сперматозоидов, пригодных для ЭКО/ICSI, анализ микроделеций Y-хромосомы также может быть рекомендован с целью исключения сочетанного поражения сперматогенеза и мужского бесплодия, а также использован при обследовании пациентов с НФП.

Хотя исследование Y-хромосомы на наличие микроделеций в локусе AZF может быть выполнено с помощью различных молекулярно-генетических методов, наибольшее распространение получила мультиплексная ПЦР. Для детекции

делеций в каждом регионе (AZFa, AZFb и AZFc) необходимо исследовать наличие ≥ 2 маркеров, специфичных для каждого региона, а также 1-2 маркера внутреннего контроля реакции. “Золотым стандартом” является Руководство по лабораторной диагностике микроделеций Y-хромосомы, предложенное Европейской Ассоциацией андрологов (ЕАА) и принятой Европейской организацией по контролю качества молекулярно-генетической диагностики, EMQN [Simoni et al., 1999; 2004; Krausz et al., 2014]. В нем описана методика детекции микроделеций Y-хромосомы, захватывающих 1-3 региона AZF, с помощью мультиплексной ПЦР со следующим набором STS-маркеров: sY84, sY86 для AZFa, sY127, sY134 для AZFb и sY254, sY 255 для AZFc, маркеры для внутреннего контроля реакции *SRY* и *ZFX/Y*).

Анализ микроделеций может быть выполнен до, после и одновременно с анализом кариотипа. В тех случаях обнаружения AZF делеций у пациентов, которым не был выполнен анализ кариотипа, необходимо проведение цитогенетического исследования для уточнения типа перестройки Y-хромосомы. В случаях несовпадения результатов цитогенетического и молекулярно-генетического исследования требуется повторное цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование. Также следует быть настороженным при обнаружении сочетанных («прерывистых») микроделеций Y-хромосомы, а также делеций единичных локусов. В таких случаях необходимо их верификация, уточнение размера делеции.

Клиническая значимость частичных AZF делеций, в частности делеций AZFc региона, пока точно не определена, поэтому их исследование не является обязательной частью анализа микроделеций Y-хромосомы. Важно отметить, что частичные AZFc делеции, а также некоторые микроделеции AZFa и AZFb регионов, часто представляют собой наследуемые полиморфные варианты Y-хромосомы. Их наличие у мужчин не должно однозначно рассцениваться как причина бесплодия и ни в коей мере не является показанием для выбора пола плода, в том числе с помощью преимплантационной диагностики в программах экстракорпорального оплодотворения, ЭКО/ICSI. В отношении ‘классических’ AZF делеций общепринятые рекомендации по преимплантационной диагностике также отсутствуют.

ВЫВОДЫ

1. В выборке из 6085 пациентов с нарушением формирования пола и/или репродукции при использовании стандартного цитогенетического исследования хромосомные мутации обнаружены у 5,11% обследованных (частота гоносомных - 4,39%, аутосомных - 0,66%, аутосомно-гоносомных мутаций - 0,12%). Наибольшее количество (87,2%) выявленных мутаций составили числовые и структурные перестройки половых хромосом. Среди аномалий гоносом превалировала анеуплоидия по хромосоме X, детектированная у 55,8% всех пациентов с мутациями половых хромосом. При синдроме Клайнфельтера регулярная форма дисомии X (кариотип 47,XXY) составила 87,4% случаев. Мозаицизм по половым хромосомам у 26,4% пациентов с аномалиями гоносом.
2. У 43% пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера обнаружена регулярная моносомия X (45,X), у 20,4% - мозаицизм по хромосоме X, 9,3% - наличие перестроенной X-хромосомы и 8,4% - Y-хромосомы. С помощью стандартного цитогенетического исследования мозаицизм 45,X/46,XY, структурные перестройки Y или маркерные хромосомы диагностированы у 5%, 2,2% и 6,5% больных, соответственно. С помощью молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического исследования скрытый мозаицизм по хромосоме Y выявлен у 16,7% 45,X больных, делеции гена *SRY* у 8% (Y+) пациенток. Соотношение маркерных хромосом X- и Y-derivатов составило 1:1.
3. Среди пациентов мужского пола с несбалансированными структурными перестройками Y-хромосомы и/или X/XY мозаицизмом ген *SRY* обнаружен у 98,3% пациентов. Делеции длинного плеча Y-хромосомы в локусе AZF обнаружены в 63% случаях. Среди них преобладали терминальные Yq и дицентрики Yp с точками разрыва в Yq11.2. Не обнаружено достоверного различия в частоте AZF делеции у детей и взрослых пациентов мужского пола с мозаицизмом X/XY и его вариантам ($p > 0.05$). У пациентов с анорхией/монорхией в 20,8% выявлены X/XY мозаицизм и/или микроделеции Y-хромосомы (в регионе AZFc), не обнаружено делеций гена *SRY*. Все мутации выявлены у пациентов с монорхизмом, при анорхизме мутации половых хромосом не обнаружены.
4. При использовании только стандартного цитогенетического исследования выявлены ошибки кариотипирования (ложноположительная и ложноотрицательная

диагностика) у 40% XX/XY пациентов. Установлено происхождение кариотипа 46,XX/46,XY в результате гоносомного мозаицизма (n=3) или истинного химеризма (n=2). Делеция гена *SRY* выявлена у 6,3% XX/XY пациентов, AZF делеции не обнаружены. При анализе фенотипа пациентов с кариотипом 46,XX/46,XY выявлено соотношение мужского, двойственного и женского развития гениталий как 6:6:4, соответственно. Выявлен случай сохранения фертильности у женщины с нарушением формирования пола и кариотипом 46,XX/46,XY.

5. Выявлена генетическая гетерогенность 46,XX и 46,XY-дисгенезии, обусловленных мутациями гоносом. У 32% пациентов с XX-дисгенезией гонад обнаружены гоносомные мутации: скрытый мозаицизм по хромосоме X или Y, структурные перестройки хромосомы X, X-Y транслокация. У 10,8% (Y+) XY-больных с женским фенотипом обнаружены структурные перестройки Y с утратой/без локуса *SRY*: изодицентрическая Yq хромосома, делеции Y-специфичных последовательностей вследствие X-Y транслокаций, скрытый гоносомный мозаицизм.

6. При комплексном анализе гоносом в группе больных с овотестикулярной формой нарушения формирования пола кариотип 46,XX выявлен у 75% обследованных. Y-позитивные генотипы определены в 25% случаев (46,XY, химеризм XX/XY, мозаицизм по *SRY*+ isoYp изохромосоме). Выявлена возможность различных клинических форм аномалий формирования пола у сибсов (XX инверсия и овотестикулярной форма) при кариотипе 46,XX и генотипе *SRY*-.

7. Ген *SRY* обнаружен у 84% пациентов с XX-инверсией пола, в 82% случаев обусловленной ее транслокационной (Yp+) формой, в 2% - скрытым мозаицизмом по хромосоме Y. У 87% пациентов при цитогенетическом исследовании установлен кариотип 46,XX, у 13% – другие кариотипы, характерные для XX-инверсии пола. Наличие явного или скрытого гоносомного мозаицизма (по Y или по X) обнаружено у 15,7% обследованных. Среди выявленных случаев преобладал мозаицизм по X-хромосоме, обнаруженный только среди *SRY* позитивных пациентов. При анализе фенотипа неполная маскулинизация выявлена у 28% больных отмеченная в 1,75 раза чаще у *SRY* негативных мужчин, чем *SRY* позитивных. Мутации гена *SOX3* у 16 пациентов, имеющих 46,XX-тестикулярную или овотестикулярную форму нарушения формирования пола. Среднее количество CAG-повторов в экзоне 1 гена

AR у пациентов с XX инверсией пола (n=19) и с синдромом Клайнфельтера (n=72) соответствует норме – $20,91 \pm 4,46$ и $23,12 \pm 5,42$, соответственно. Экстремально неравномерная инактивация X-хромосомы (более 90%:10%) обнаружена при XX-инверсии пола (2 из 16 пациентов) и не выявлена при синдроме Клайнфельтера (n=30).

8. Аномальная рекомбинация между X-Y гомологичными генами/локусами, характерна для Xp;Yp (*PRKX/Y*) и Xq;Yp (*PCDH11X/Y*) транслокаций и терминальных делеций гоносом. Схожесть локализации точек разрыва при X-Y транслокациях, терминальных делециях X и Y свидетельствует об общности механизмов их возникновения в мейозе у мужчин. Рекомбинация между гомологичными регионами (палиндромы) Y-хромосомы может приводить к образованию дицентрических хромосом Yp и AZF-микроделеций в регионах AZFb и AZFc; рекомбинация в пределах PAR1 региона Y-хромосомы – к образованию Yq дицентриков.

9. На основании комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического обследования 8239 мужчин с нарушением репродуктивной функции определены частота и спектр аномалий Y хромосомы: числовые аномалии (дисомии и мозаицизм по Y) составили 1,5%; микроструктурные перестройки – 18%; структурные перестройки – 1%. Большая часть (86,7%) выявленных мутаций представлена микроделециями Yq11.23/AZFc. У пациентов с синдромом Клайнфельтера микроделеции AZFc обнаружены в 15% случаев; с дисомией и полисомией Y – 45,5%; с аутосомно-гоносомными транслокациями в 16,7%; сбалансированными перестройками аутосом/Yхромосомы 23,3%; с гетероморфизмом Y хромосомы или подозрением на наличие Yq делеций – 47%.

10. При анализе гено-фенотипических корреляций в группах пациентов с аномалиями гоносом выявлено наибольшее фенотипическое разнообразие у больных мозаицизмом/химеризмом X/X_Y, XX/X_Y (развитие по мужскому, женскому типу или двойственное строение гениталий). В выборке из X/X_Y мозаиков (n=71), имеющих различный пол (мужской, n=36; или женский, n=35), не выявлено значимого различия по среднему значению количества Y-позитивных клеток в лимфоцитах периферической крови ($70,6 \pm 20,9\%$ и $61,6 \pm 22,2\%$, соответственно). У пациентов с кариотипом 46,XX/46,X_Y, выявлена прямая

зависимость степени маскулинизации от количества Y-позитивных клеток ($p=0.023$). При количестве Y-несущих клеток более 30%, у них отмечена выраженная (от двойственного развития гениталий до частичного дефицита маскулинизации) или нормальная маскулинизация половых органов.

11. Выявлено значимое (от 3-х до 13-кратного) увеличение частоты анеуплоидии по гоносомам и аутосомам (13, 18 и 21) в сперматозоидах мужчин с анеусомией по хромосоме X или Y, пациентов с цитогенетическими и микроструктурными перестройками Y. Частота анеуплоидии зависит от тяжести мутаций гоносом, а также от степени нарушения сперматогенеза. Наибольшая частота мутаций половых хромосом выявлена при синдроме Клайнфельтера, транслокации $t(Y;21)$, а для аутосом – при полной AZFc (b2/b4) делеции.

12. На основе полученных результатов разработаны алгоритмы цитогенетического и молекулярно-генетического обследования для 6 синдромов (синдром Шерешевского-Тернера, синдром Клайнфельтера, 46,XX-тестикулярная форма и овотестикулярная форма, XX- и XY-дисгенезия гонад), связанных с нарушением формирования пола и аномалиями половых хромосом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Стандартное цитогенетическое исследование (анализ кариотипа) необходимо выполнять всем пациентам, имеющих аномалии формирования пола, нарушение полового развития (в том числе крипторхизм), выраженное нарушение гаметогенеза (аменорею, азооспермию и олигозоосперию тяжелой степени), всем супружеским парам с бесплодием, привычным невынашиванием, перед проведением программ ЭКО/ICSI, неудачными попытками использования ВРТ, а также всем донорам половых клеток.

2. Пациентам, которым в ходе пренатальной генетической диагностики обнаружены аномалии половых хромосом, необходимо постнатальное цитогенетическое или комплексное генетическое обследование.

3. Пациентам, у которых при стандартном цитогенетическом исследовании обнаружен кариотип 46,XX/46,XY, требуется верификация кариотипа с помощью цитогенетических и/или молекулярно-генетических методов исследования, молекулярно-генетическое исследование на химеризм.

4. У пациентов с низкоуровневым мозаицизмом по половым хромосомам по данным исследования лимфоцитов периферической крови, а также у пациентов с подозрением на скрытый гоносомный мозаицизм необходимо проведение молекулярно-цитогенетического/молекулярно-генетического исследования гоносом в других тканях (например, в буккальном эпителии).
5. У мужчин с гетерозиготностью по количеству повторов CAG в экзоне 1 гена андрогенового рецептора (*AR/HUMARA*), с нормальным набором половых хромосом (с кариотипом 46,XY) по данным стандартного цитогенетического исследования, необходимо выполнять молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH анализ) с целью выявления скрытого гоносомного мозаицизма по хромосоме X (например, XY/XXY).
6. У пациентов с монорхизмом и нормальным набором гоносом/кариотипом 46,XY необходимо проведение молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического исследования для обнаружения гоносомного мозаицизма и микроструктурных перестроек Y-хромосомы.
7. Пациенткам с регулярной формой моносомии X (с кариотипом 45,X) по данным стандартного цитогенетического исследования рекомендовано молекулярно-генетический анализ Y-специфичных локусов (*SRY*, *AMELX/Y*, *AZF*, др.) для детекции возможного скрытого мозаицизма по хромосоме Y.
8. Пациенткам с аутомно-гоносомными перестройками и структурными аномалиями хромосомы X (при наличие 2 хромосом X/локусов Xq13) необходимо рекомендовать анализ инактивации X-хромосомы с целью определения характера лайонизации.
9. Пациентам, у которых при стандартном цитогенетическом исследовании обнаружены маркерные хромосомы (mar), предположительного гоносомного происхождения, необходимо выполнять цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование для определения их происхождения (дериваты X или Y).
10. Пациенткам, у которых при цитогенетическом исследовании в кариотипе обнаружено наличие Y-хромосомы или ее материала, например, при XY-дисгенезии гонад, синдроме Шерешевского-Тернера, необходимо проводить

молекулярно-генетический анализ последовательностей Y-хромосомы (*SRY*, *AMELX/Y*, *AZF*, др.).

11. Мужчинам с бесплодием и гетероморфизмами Yqh, а также мужчинам с делециями длинного плеча Y-хромосомы или подозрением на структурную перестройку Y (по данным цитогенетического исследования) необходимо проведение молекулярно-генетического исследования на наличие делеций в локусе AZF.

12. Мужчинам с азооспермией/криптозооспермией перед биопсией яичка и процедуры ЭКО/ICSI необходимо проведение цитогенетического исследования (анализа кариотипа) и анализа микроделеций Y-хромосомы.

13. Определение частоты анеуплоидии в сперматозоидах (с помощью FISH анализа) может быть рекомендовано мужчинам, имеющим в кариотипе аномалии аутосом или половых хромосом, при достаточном для анализа количестве сперматозоидов (кроме азооспермии и криптозооспермии).

14. При обнаружении у пациентов с транссексуализмом аномалий половых хромосом или несоответствия (имевшегося изначально) соматического пола набору гоносом требуется проведение дифференциальной диагностики транссексуализма от других аномалий формирования пола (например, связанных с нарушением дифференцировки гонад или гормональной регуляции развития половой системы).

15. Родителям (и в некоторых случаях сибсам, например, однойцевым близнецам) пациентов с аномалиями гоносом необходимо проведения цитогенетического исследования и/или молекулярно-генетического анализа половых хромосом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты // СПб.: изд. Н-Л, 2007. – 640 с.
2. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л., Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом // М.: Т-во научных изданий КМК, 2007. – 358 с.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. М. ГЭОТАР-МЕД, 2002. 449 с.
4. Вяткина С.В. Комплексная характеристика нарушений половых хромосом у пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера. Автореферат кандид. дисс... С.-П., 2003; 18 с.
5. Вяткина С.В. Нагорная И.И., Логинова Ю.А., Лязина Л.В., Васильева И.Ю., Прозорова М.В., Верлинская Д.К., Кузнецова Т.В. Цитогенетический и молекулярный анализ мозаицизма у пациенток с синдромом Шерешевского-Тернера // Медицинская генетика. – 2003. – №3. – С. 124-129.
6. Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф. Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин // Пробл. Репрод. – 1998а. – Т. 4. – № 2. – С. 12-21.
7. Ворсанова С.Г., Берешева Л.З., Демидова И.А., Шаронин В.О., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции // Проблемы Репродукции. – 1998б. – № 4. – С. 41-46.
8. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. Медпрактика-М, М., 2006. 299 с.
9. Гоголевский П.А., Калугина А.С., Бондарев Д.А., Гоголевская И.К., Крамеров Д.А., Здановский В.М., Тогобецкий А.С., Литвененко В.М., Бондарев Д.А., Курило Л.Ф., Черных В.Б. AZF-микроделеции и мужское бесплодие // Андрология и генитальная хирургия 2001; 4: 73-77.
10. Голубева И.В. Гермафродитизм (клиника, диагностика, лечение). М.: Медицина 1980; 157 с.

11. Гордеева Е.Г., Шилейко Л.В., Панкратова О.С., Курило Л.Ф. Частота анеуплоидий в гаметах у фертильных мужчин // Генетика. – 2011. - Том. 47., № 6. - С. 828-835.
12. Гордеева Е.Г., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В., Борзова О.С., Магомедова Х.Д., Кузина Н.Ю., Баркова О.В., Курило Л.Ф. Частота встречаемости гамет с анеуплоидией у мужчин с нарушением репродуктивной функции // Мед. генетика. – 2013. - № 2. - С. 18-24.
13. Давиденкова Е.Ф., Верлинская Д.К., Тысячнюк С.Ф. Клинические синдромы при аномалиях половых хромосом. Л. – Медицина. – 1973. 98 с.
14. Дедов И.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А. Половое развитие детей: норма и патология. М: Медицина. – 2002. 232с.
15. Дергачева А.Ю. Молекулярно-генетическое исследование синдрома тестикулярной феминизации. Автореферат кандид. дисс... М, 2002; 22 с.
16. Жуковский М.А. Нарушения полового развития. М.: Медицина 1989; 181–193.
17. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Атлас. М., 1982; 263 с.
18. Золотухина Т.В., Шилова Н.В., Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Цветкова Т.Г., Маркова Ж.Г., Антоненко В.Г. Использование FISH-метода для диагностики и характеристики конституциональных хромосомных aberrаций // Медицинская Генетика. – 2011. – Т. 10, № 11 (113). – С. 3-8.
19. Козлова С.И., Демикова Н.С. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. Атлас-справочник. 3-е изд. Перераб. И дополн. М.: Т-во научных изданий КМК; Авторская академия, 2007. 448с.
20. Кулешов Н.П., Частота возникновения и судьба хромосомных аномалий у человека // автореф. дисс. докт. мед. наук., Медико-генетич. науч. центр РАМН, М. – 1979. – 45 с.
21. Кулешов Н.П., Современные проблемы в клинической цитогенетике. // Сб. научн. трудов. - М.: 1991. – С. 91-163.
22. Курило Л.Ф., Морфо-функциональные характеристики оогенеза млекопитающих и человека // автореф. дисс. докт. биол. наук., 03.00.11, инст. Биол. Разв. Им. Н.К. Кольцова РАН, М. - 1985. – 47 с.

23. Курило Л.Ф. Аномалии развития половой системы вследствие генных мутаций // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – №2. – С. 58-65.
24. Курило Л.Ф. Хромосомные заболевания органов половой системы // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – №1. – С. 48-59.
25. Курило Л.Ф., Андреева М.В., Коломиец О.Л., Сорокина Т.М., Черных В.Б., Шилейко Л.В., Хаят С.Ш., Демикова Н.С., Козлова С.И. Генетические синдромы с нарушениями развития органов половой системы // Андрология и генитальная хирургия. – 2013. – №4. – С. 17-27.
26. Курило Л.Ф., Любашевская И.А., Дубинская В.П., Гаева Т.Н., Количественный кариологический анализ состава незрелых половых клеток из эякулята // Урол. и Нефрол. – 1993. - № 5. – С. 45-47.
27. Курило Л.Ф., Дубинская В.П., Остроумова Т.В., Шилейко Л.В., Мхитаров В.А., Литвиненко В.М. Оценка сперматогенеза по незрелым половым клеткам эякулята. Пробл репрод 1995; 1: 3: 33-38.
28. Курило Л.Ф., Чеботарев А.Н., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В., Гаева Т.Н., Мхитаров В.А., Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных этапах их дифференцировки в биоптате яичка и эякуляте у пациентов с азооспермией и олигозооспермией // Пробл. Репрод. – 1997. – Т. 3, № 1. – С. 80-84.
29. Курило Л. Ф. Схема комплексного медико-генетического обследования пациентов с мужским бесплодием неясного генеза // Тез. докл. рос. научно-практ. конф. “Медико-генетич. консультирование в профилактике наследственных болезней”. МЗ РФ, МНОМТ, МГНЦ РАМН, Москва, XI/1997. - С. 154-155.
30. Курило Л. Закономерности овариоогенеза и оогенеза млекопитающих. Lambert Acad. Publ. 2012. 280с.
31. Курило Л.Ф., Гришина Е.М., Роль структурных хромосомных аномалий в развитии патозооспермии у мужчин с бесплодием // Андрол. и генит. хирург. – 2006. - № 4. – С. 36-40.

32. Курило Л.Ф., Шаронин В.О., Савельева А.П., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Нерасхождение хромосом половых клеток как причина патозооспермии и бесплодия // Андрол. и генит. хирург. – 2002. - № 3. – С. 20-21.
33. Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Сорокина Т.М., Гришина Е.М. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы. Вест. РАМН 2000; 5: 32-36.
34. Курило Л.Ф. Частота и структура хромосомных aberrаций у пациентов с репродуктивной недостаточностью // Мед. генетика. – 2007. - Т. 6, № 10 (64). - С. 41-44.
35. Курило Л.Ф., Козлов Г.И., Федотов В.П. и др. Клинико-цитогенетическое обследование пациента с кариотипом 46,XX, азооспермией и бесплодием // Пробл эндокр – 1994. – 40 (2). – С. 50-51.
36. Курило Л.Ф., Хаят С.Ш., Калинин С.Ю., Слонимский Б.Ю., Сорокина Т.М. Нарушение развития структур головного мозга при транссексуализме (обзор литературы) // Андрология и генитальная хирургия. – 2013. – №3. – С. 12-18.
37. Лебедев И.Н. Хромосомные болезни. Наследственные болезни: национальное руководство // под ред. акад. РАМН Бочкова Н.П., акад. РАМН Гинтера Е.К., акад. РАМН Пузырева В.П. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 555-610.
38. Лебедев И.Н., Современные молекулярно-цитогенетические технологии в репродуктивной биологии и медицине // Мед. генетика. – 2007. – Том. 6, № 10 (64). – С. 21-26.
39. Логинова Ю.А., Нагорная И.И., Шлыкова С.А., Рыбакова М.В., Чиряева О.Г., Корнилов Н.В., Кузнецова Т.В. Цитогенетическое исследование и микроделеционный анализ локусов AZF у пациентов с азооспермией и олигозооспермией неясного генеза перед проведением ИКСИ. Пробл репрод 2000; 5: 27-33.
40. Назаренко С.А. Изменчивость хромосом и развитие человека. Томск: Изд-во Томского Государственного Университета, 1993. 200 с.
41. Осипова Г.Р. Исследование гена SRY при некоторых нарушениях детерминации пола (XY “чистой” форме дисгенезии гонад, синдроме

- Шерешевского-Тернера, XX-инверсии пола). Автореферат канд. дисс... М., 1997; 15 с.
42. Прокофьева-Бельговская А.А., Бочков Н.П., Гринберг К.Н., Мирзаянц Г.Г., Погосянц Е.Е., Пяткин Е.К., Ревазов А.А., Стонова Н.С., Основы цитогенетики человека // Прокофьева-Бельговская А.А. (ред.) – М.: «Медицина», 1969. – 543 с.
 43. Райцина С.С., Цикл сперматогенного эпителия и кинетика сперматогенеза у млекопитающих // Современные проблемы сперматогенеза. – Бурнашева С.А., Габаева Н.С., Данилова Л.В., Князева Е.Ф., Костомарова А.А., Райцина С.С., М.: Наука, 1982. – С. 73-107.
 44. Райцина С.С., Гормональный контроль сперматогенеза // Сперматогенез и его регуляция. – Габер Е.С., Данилова Л.В., Князева Е.Ф., Костомарова А.А., Наук В.А., Петросьян Ж.Л., Райцина С.С., Ротт Н.Н. – М.: Наука, 1983. – С. 4-30.
 45. Райцина С.С., Сперматогенез и структурные основы его регуляции // М.: Наука, 1985. – 205 с.
 46. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. - М.: МедиаСфера, 2002. - 312 с.
 47. Савельева А.П., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Козлов Г.И., Калинин С.Ю., Шаронин В.О., Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Частота нерасхождения хромосом в половых клетках пациентов с нарушением репродуктивной функции // Пробл. Репрод. – 2001. – Т. 7, № 2. – С. 73-78.
 48. Савельева А.П., Структура хромосомной патологии среди пациентов с мужским бесплодием и патозооспермией // автореф. дисс. канд. биол. наук., 03.00.15, 03.00.25, Медико-генетич. науч. центр РАМН, М. – 2002. – 31 с.
 49. Сухих Г.Т., Марченко Л.А., Чернышова Н.А., Карселадзе А.И., Бутарева Л.Б., Строганова А.М., Табеева Г.И., Сметник В.П. Ограниченный тканевый мозаицизм по половым хромосомам у больных с преждевременной яичниковой недостаточностью. Пробл. Репрод. 2009; 3: 87-92.
 50. Тарская Л.А. Клинико-цитогенетический анализ аномалий полового развития (синдром Шерешевского-Тернера и смешанная дисгенезия гонад). Автореферат кандид. дисс... М., 1996; 26 с.

51. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1975. - 296 с.
52. Федорова И.Д., Логинова Ю.А., Леонтьева О.А., Петрова Л.И., Чиряева О.Г., Кузнецова Т.В., Баранов В.С., Анализ частоты гетероплоидии в сперматозоидах человека при нарушениях фертильности // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 346-350.
53. Федорова И.Д. Цитогенетическая характеристика эякулированных клеток сперматогенного ряда человека // дисс. канд. биол. наук., 03.00.15, Санкт-Петербургский государственный университет, Спб. – 2004. – 143 с.
54. Фогель Ф., Мотульски А., Генетика человека: Проблемы и подходы. В 3-х т. // Т. 1: пер. с англ. - М.: Мир, 1989. – 312 с.
55. Черных В.Б. Макро- и микроструктурные перестройки Y-хромосомы. Медицинская генетика. 2007; №10. Т.6. С. 45-52.
56. Черных В.Б., Курило Л.Ф. Генетическая контроль дифференцировки пола у человека. Генетика 2001а; 37: 10: 1317-1329.
57. Черных В.Б., Курило Л.Ф. Генетический контроль гормональной регуляции дифференцировки пола и развития половой системы у человека. Генетика 2001б; 37: 10: 1475-1485.
58. Черных В.Б., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Ширшова Л.С., Чухрова А.Л., Поляков А.В., Гоголевский П.А., Калугина А.С., Тогобецкий А.С., Здановский В.М., Гоголевская И.К., Крамеров Д.Н. Анализ микроделений в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследований // Мед. генетика. – 2003. – Т. 2, №8. – С. 367-379.
59. Черных В.Б., Сорокина Т.М., Гришина Е.М. и др. Кольцевая Y-хромосома: клинический случай и обзор литературы // Мед. Генетика. – 2004. – Т. 3. – №10. – С. 474-479.
60. Черных В.Б., Чухрова А.Л., Бескоровайная Т.С., Гришина Е.М., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Гоголевский П.А., Калугина А.С., Морина Г.В., Тогобецкий А.С., Таневский В.Э., Здановский В.М., Гоголевская И.К., Крамеров Д.А., Поляков А.В., Курило Л.Ф. Типы делеций Y-хромосомы и их частота у мужчин с бесплодием. Генетика 2006; 42(8): 1130-1136.

61. Шаронин В.О. Роль молекулярно-цитогенетических исследований хромосомных аномалий соматических и половых клеток при нарушении репродуктивной системы у пациентов мужского пола. Автореферат кандид. дисс... М., 1998; 24 с.
62. Шаронин В.О., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Мхитарова Е.В., Дисомия хромосом в половых клетках мужчин при нарушении сперматогенеза // Пробл. Репрод. – 1999. – Т. 5, № 1. – С. 50-53.
63. Ширшова Л.С. Цитогенетическое и дерматоглифическое исследование при бесплодии у мужчин, связанном с нарушением сперматогенеза по типу азооспермии. Автореферат кандид. дисс... М., 1992; 22 с.
64. Abbas N., McElreavey K., Leconiat M., Vilain E., Jaubert F., Berger R., Nihoul-Fekete C., Rappaport R., Fellous M. Familial case of 46,XX male and 46,XX true hermaphrodite associated with a paternal-derived SRY-bearing X chromosome. C R Acad Sci III. 1993; 316 (4): 375-383.
65. Abdelmoula N.B., Amouri A. Dicentric Y chromosome // Ann. Biol. Clin. (Paris). – 2005. – Vol. 63. – №4. – P. 363-375.
66. Abdelmoula N.B., Portnoi M.F., Keskes L., Recan D., Bahloul A., Boudawara T., Saad A., Rebai T. Skewed X-chromosome inactivation pattern in SRY positive XX maleness: a case report and review of literature // Ann Genet. – 2003. – V. 46. – P. 11-18.
67. Abusheikha N., Lass A., Brinsden P. XX males without SRY gene and with infertility // Hum Reprod. – 2001. – V. 16 (4). – P. 717-718.
68. al-Gazali L.I., Mueller R.F., Caine A., Antoniou A., McCartney A., Fitchett M., Dennis N.R. Two 46,XX,t(X;Y) females with linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.3. J Med Genet. 1990; 27 (1): 59-63.
69. Allen R.C., Zoghbi H.Y., Moseley A.B., Rosenblatt H.M., Belmont J.W. Methylation of Hpa II and Hha I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am. J. Hum. Genet. 1992; 51: 1229-1239.
70. Alvarez-Nava F., Puerta H. Y-chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients. Am. J. Med. Genet. 2006; 140: 1124-1126.

71. Alvarez-Nava F., Puerta H., Soto M., Pineda L., Temponi A. High frequency of Y-chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis. *Fertil. Steril.* 2008; 89 (2): 458-460.
72. Andersson M., Page D.C., de la Chapelle A. Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of X chromosome in human XX males. *Science.* 1986; 233 (4765): 786-768.
73. Andersson M., Page D.C., Pettay D. et al. Y:autosome translocations and mosaicism in the aethiology of 45,X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 1988; 79: 2-7.
74. Annerén G., Andersson M., Page D.C., Brown L.G., Berg M., Läckgren G., Gustavson K.H., de la Chapelle A. An XXX male resulting from paternal X-Y interchange and maternal X-X nondisjunction. *Am J Hum Genet.* 1987; 41 (4): 594-604.
75. Arnedo N., Nogués C., Bosch M. et al. Mitotic and meiotic behavior of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Hum Reprod.* 2005; 20: 462-468.
76. Ashton F., O'Connor R., Love J.M., Doherty E., Aftimos S., George A., Love D.R. Molecular characterisation of a der(Y)t(Xp;Yp) with Xp functional disomy and sex reversal. *Genet Mol Res.* 2010; 9 (3): 1815-1823.
77. Aydos S., Tükün A., Bökesoy I. Gonadal dysgenesis and the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a girl with 46,X,del(X)(pter→q22:). *Arch. Gynecol. Obstet.* 2003; 267 (3): 173-174.
78. Bachtrog D. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration // *Nat Rev Genet.* 2013;14(2):113-124.
79. Ballabio A., Bardoni B., Carozzo R., Andria G., Bick D., Campbell L., Hamel B., Ferguson-Smith M.A., Gimelli G., Fraccaro M. et al. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989; 86 (24): 10001-10005.
80. Ballabio A., Andria G. Deletions and translocations involving the distal short arm of the human X chromosome: review and hypotheses. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 221-227.

81. Barbaux S., Vilain E., Raoul O. et al. Proximal deletions of the long arm of the Y chromosome suggest a critical region associated with a specific subset of characteristic Turner stigmata // *Hum. Mol. Genet.* – 1995. – V. 4: 9: 1565-1568.
82. Behre H.M., Nieschlag E., Meshede D. et al. In Nieschlag E., Behre H. (eds). *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag, Berlin. 1997; P. 115-129.
83. Bergeron M.B., Brochu P., Lemyre E. et al. Correlation of intercentromeric distance, mosaicism, and sexual phenotype: molecular localization of breakpoints in isodicentric Y chromosomes. *Am. J. Med. Genet. A* 2011; 155: 2705-2712.
84. Bernstein R., Rosendorff J., Ramsay M., Pinto MR., Page D.C. A unique dicentric X;Y translocation with Xq and Yp breakpoints: cytogenetic and molecular studies. *Am. J. Hum. Genet.* 1987; 41(2): 145-156.
85. Berta P., Hawkins J.R., Sinclair A.H., Taylor A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N., Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*. 1990; 348 (6300): 448-450.
86. Bertini V., Canale D., Bicocchi M.P. et al. Mosaic ring Y chromosome in two normal healthy men with azoospermia. *Fertil. Steril.* 2005; 84: 6: 1744.
87. Bettio D., Venci A., Rizzi N. et al. Clinical and molecular cytogenetic studies in three infertile patients with mosaic rearranged Y chromosomes. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 972-975.
88. Bofinger M.K., Needham D.F., Saldana L.R., Sosnowski J.P., Blough R.I. 45,X/46,X,r(Y) karyotype transmitted by father to son after intracytoplasmic sperm injection for oligospermia. A case report. *J. Reprod. Med.* 1999; 44 (7): 645-648.
89. Bigozzi U., Simoni G., Montali E., Dalpra L., Rossella F., Piazzini M., Borghi A. 47,XXX chromosome constitution in a male. *J. Med. Genet.* 1980; 17 (1): 62-66.
90. Blagosklonova O., Fellmann F., Clavequin M.C., Roux C., Bresson J.L. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6: 9: 795-769.
91. Blagowidow N., Page D.C., Huff D., Mennuti M.T. Ullrich-Turner syndrome in an XY female fetus with deletion of the sex-determining portion of the Y chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 1989; 34 (2): 159-162.

92. Blanco J., Egozcue J., Vidal F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 2001; 16 (5): 887-892.
93. Blanco J., Farreras A., Egozcue J. et al. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) patient assessed by FISH. *Fertil. Steril.* 2003; 79: 913-918.
94. Blaschke R.J., Rappold G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006; 16 (3): 233-239.
95. Bofinger M.K., Needham D.F., Saldana L.R. et al. 45,X/46,X,r(Y) karyotype transmitted by father to son after intracytoplasmic sperm injection for oligozoospermia. *J. Reprod. Med.* 1999; 44: 645-648.
96. Bohec C., Douet-Guilbert N., Basinko A., Le Bris M.J., Marcorelles P., Audrézet M.P., Tetefort R., Bages K., Collet M., Morel F., De Braekeleer M. Difficult diagnosis and management of an heterokaryotypic monochorionic twin pregnancy with discordant fetal sex and 45,X/47,XYY karyotypes. *Fetal Pediatr. Pathol.* 2010; 29 (6): 424-430.
97. Boklage C.E. Embryogenesis of chimeras, twins and anterior midline asymmetries. *Hum. Reprod.* 2006; 21 (3): 579-591.
98. Bolduc V., Chagnon P., Provost S., Dubé M., C.Belisle, M. Gingras, L. Mollica, Busque L. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (1): 333-341.
99. Boucekkine C., Toublanc J.E., Abbas N., Semrouni M., Vilain E., McElreavey K., Mugneret F., Fellous M. The sole presence of the testis-determining region of the Y chromosome (SRY) in 46,XX patients is associated with phenotypic variability. *Horm Res.* 1992; 37 (6): 236-240.
100. Brauner R., Neve M., Allali S., Trivin C., Lottmann H., Bashamboo A., McElreavey K. Clinical, biological and genetic analysis of anorchia in 26 boys. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23292.
101. Brisset S, Izard V, Misrahi M, Aboura A, Madoux S, Ferlicot S, Schoevaert D, Soufir JC, Frydman R, Tachdjian G. Cytogenetic, molecular and testicular tissue

- studies in an infertile 45,X male carrying an unbalanced (Y;22) translocation: case report //Hum Reprod. 2005 Aug;20(8):2168-72.
102. Brosman S.A. Mixed gonadal dysgenesis. *J. Urol.* 1979; 121: 344.
 103. Bukvic N., Cesarano C., Ceccarini C., Bruno M., Lipsi M.R., Gallicchio M.G., Carboni M.A., Valente L., Cotoia G., Antonetti R. Characterization of the first adult de novo case of 46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.3;q11.2). *Gene.* 2013; 513 (1): 111-117.
 104. Buonadonna AL, Cariola F, Caroppo E, Di Carlo A, Fiorente P, Valenzano MC, D'Amato G, Gentile M. Molecular and cytogenetic characterization of an azoospermic male with a de-novo Y;14 translocation and alternate centromere inactivation. *Hum Reprod.* 2002 Mar;17(3):564-569.
 105. Burgoyne P.S. The role of Y-encoded genes in mammalian spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 4: 423-432.
 106. Canto P., Kofman-Alfaro S., Jiménez A.L., Söderlund D., Barrón C., Reyes E., Méndez J.P., Zenteno J.C. Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2004; 150 (1): 70-72.
 107. Carvalho F.M., Wolfgramm E.V., Degasperi I. et al. Molecular cytogenetic analysis of a ring-Y infertile male patient. *Genet. Mol. Res.* 2007; 6 (1): 59-66.
 108. Ceylan C., Ceylan G.G., Serel T.A. The azoospermia factor locus-c region was found to be related to Klinefelter syndrome in Turkish patients. *Genet. Mol. Res.* 2010; 9 (2): 1229-1133.
 109. Chandley A.C., Edmond P. Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics.* 1971; 10 (4): 295-304.
 110. Chang H.J., Clark R.D., Bachman H. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet.* 1990; 46(1):156-167.
 111. Chang P., Sauer M., Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four sons. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2689-2694.
 112. Charlesworth B. The evolution of sex chromosomes. *Science* 1991; 4997: 1030-1033.

113. Chen CP, Lin SP, Tsai FJ, Wang TH, Chern SR, Wang W. Characterization of a de novo unbalanced Y;autosome translocation in a 45,X mentally retarded male and literature review. *Fertil. Steril.* 2008; 90 (4): 1198.e11-8.
114. Chen Y., Chen G., Lian Y., Gao X., Huang J., Qiao J. A normal birth following preimplantation genetic diagnosis by FISH determination in the carriers of der(15)t(Y;15)(Yq12;15p11) translocations: two case reports. *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24(10):483-488.
115. Cheng D.H., Tan Y.Q., Di Y.F., Li L.Y., Lu G.X. Crypt Y chromosome fragment resulting from an X;Y translocation in a patient with premature ovarian failure. *Fertil. Steril.* 2009; 92 (2): 828. e3-6.
116. Cheng WF, Huang SC, Ko TM. Prenatal diagnosis of 46,XX/47,XXY mosaicism: a case report. *Prenat Diagn.* 1995 Jan;15(1):64-5.
117. Chernykh V., Kurilo L., Tsvetkova T. et al. Comparative breakpoint analysis of cytogenetically detected Yq11.2 deletions and AZF microdeletions. *Chromosome Research.* 2007; 15: Suppl. 1: 88-89.
118. Choe J.H., Kim J.W., Lee J.S., Seo J.T. Routine screening for classical azoospermia factor deletions of the Y chromosome in azoospermic patients with Klinefelter syndrome. *Asian J Andrology* 2007; 9 (6): 815-820.
119. Ciccodicola A., D'Esposito M., Esposito T. et al. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9 (3): 395-401.
120. Cram D.S., Ma K., Bhasin S., Arias J., Pandjaitan M., Chu B., Audrins M.S., Saunders D., Quinn F., deKretser D., McLachlan R. Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions. *Fertil. Steril.* 2000; 74 (5): 909-915.
121. Cui Y.X., Shi Y.C., Liu Q., Xia X.Y., Lu H.Y., Shao H.F., Jia L., Yao B., Ge Y.F., Li X.J., Huang Y.F. A case of gonadism associated with y-chromosome rearrangement: cytogenetic and molecular studies. *J Androl.* 2009; 30 (6): 650-654.

122. Damiani D., Fellous M., McElreavey K., Barboux S., Barreto E.S., Dichtchekian V., Setian N. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur. J. Endocrinol.* 1997; 136 (2): 201-204.
123. Dardis A., Saraco N., Mendilaharsu H., Rivarola M., Belgorosky A. Report of an XX male with hypospadias and pubertal gynecomastia, SRY gene negative in blood leukocytes but SRY gene positive in testicular cells. *Horm. Res.* 1997; 47 (2): 85-88.
124. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6:245-250.
125. De la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 1981; 58 (1): 105-116.
126. de la Chapelle A. The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. *Development.* 1987; 101 Suppl: 33-38.
127. de la Chapelle A., Page D.C., Brown L., Kaski U., Parvinen T., Tippet P.A. The origin of 45,X males. *Am. J. Hum. Genet.* 1986; 38 (3): 330-340.
128. Delon B., Lallaoui H., Abel-Lablanche C., Geneix A., Bellec V., Benkhalifa M. Fluorescent in-situ hybridization and sequence-tagged sites for delineation of an X:Y translocation in a patient with secondary amenorrhoea. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 439-443.
129. DesGroseilliers M., Fortin F., Lafrenière A.M., Brochu P., Lemyre E., Lemieux N. Dynamic increase of a 45,X cell line in a patient with multicentric ring Y chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2006; 115 (1): 90-93.
130. DesGroseilliers M., Fortin F., Lemyre E., Lemieux N. Complex mosaicism in sex reversed SRY+ male twins. *Cytogenet. Genome Res.* 2006; 112:176-179.
131. DesGroseilliers M., Lemyre E., Dallaire L., Lemieux N. Tetrasomy Y by structural rearrangement: clinical report. *Am. J. Med. Genet.* 2002; 111 (4): 401-404.
132. Disteche C.M., Casanova M., Saal H., Friedman C., Sybert V., Graham J., Thuline H., Page D.C., Fellous M. Small deletions of the short arm of the Y chromosome in 46,XY females. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1986; 83 (20): 7841-7844.
133. Doherty M.J., Glass I.A., Bennett C.L. et al. An Xp; Yq translocation causing a novel contiguous gene syndrome in brothers with generalized epilepsy, ichthyosis, and attention deficits. *Epilepsia.* 2003; 44 (12): 1529-1535.

134. Domenice S., Nishi M.Y., Billerbeck A.E., Latronico A.C., Medeiros M.A., Russell A.J., Vass K., Carvalho F.M., Frade E.M., Arnhold I.J., Mendonca B.B. A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Hum. Genet.* 1998; 102 (2): 213-235.
135. Dos Santos A.P., Andrade J.G.R., Piveta C.S. et al. Screening of Y chromosome microdeletions in 46,XY partial gonadal dysgenesis and in patients with a 45,X/46,XY karyotype or its variants. *BMC Med. Genet.* 2013; 14:115.
136. Dupont C., Lebbar A., Teinturier C., Baverel F., Viot G., Le Tessier D., Le Bozec J., Cuisset L., Dupont J.M. First reported case of intrachromosomal cryptic inv dup del Xp in a boy with developmental retardation. *Am. J. Med. Genet. A.* 2007; 143A (11): 1236-1243.
137. Evans E.P., Breckon G., Ford C.E. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics.* 1964;3:289-94.
138. Farrugia M.K., Sebire N.J., Achermann J.C., Eisawi A., Duffy P.G., Mushtaq I. Clinical and gonadal features and early surgical management of 45,X/46,XY and 45,X/47,XYY chromosomal mosaicism presenting with genital anomalies // *J Pediatr Urol.* 2013 Apr;9(2):139-44.
139. Faure A.K., Aknin-Seifer I., Satre V. et al. Fine mapping of re-arranged Y chromosome in three infertile patients with non-obstructive azoospermia/cryptozoospermia. *Hum. Reprod.* 2007; 22 (7): 1854-1860.
140. Fechner P.Y., Marcantonio S.M., Jaswaney V., Stetten G., Goodfellow P.N., Migeon C.J., Smith K.D., Berkovitz G.D., Amrhein J.A., Bard P.A. et al. The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 76 (3): 690-695.
141. Fechner P.Y., Rosenberg C., Stetten G., Cargile C.B., Pearson P.L., Smith K.D., Migeon C.J., Berkovitz G.D. Nonrandom inactivation of the Y-bearing X chromosome in a 46,XX individual: evidence for the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Cytogenet. Cell Genet.* 1994; 66 (1): 22-26.
142. Ferguson-Smith M.A. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's syndrome. *Lancet.* 1966; 2 (7461): 475-476.

143. Ferguson-Smith M.A., Cooke A., Affara N.A., Boyd E., Tolmie J.L. Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet.* 1990; 84 (2): 198-202.
144. Ferlin A., Moro E., Rossi A., et al. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J. Med. Genet.* 2003; 40: 18-24.
145. Ferlin A., Speltra E., Garolla A., Selice R., Zuccarello D., Foresta C. Y chromosome haplogroups and susceptibility to testicular cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 2007; 13 (9): 615-619.
146. Ferlin A., Tessari A., Ganz F. et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J. Med. Genet.* 2005; 42: 209-215.
147. Fernandez R., Marchal J.A., Sanchez A., Pasaro E. A point mutation, R59G, within the HMG-SRY box in a female 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter→q11::q11→pter). *Hum. Genet.* 2002; 111(3): 242-246.
148. Fernandes S., Paracchini S., Meyer L.H., et al. A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 74: 180-187.
149. Ferrier R.A., Lowry R.B., Lemire E.G., Stoeber G.P., Howard J., Parboosingh J.S. Father-to-son transmission of an X-linked gene: a case of paternal sex chromosome heterodisomy. *Am. J. Med. Genet. A.* 2009; 149A (12): 2871-2873.
150. Flaquer A., Rappold G.A, Wienker T.F. et al. The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologist. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008; 16: 771-779.
151. Flannigan R.K., Chow V., Ma S., Yuzpe A. 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenesis: a case of successful sperm extraction // *Can. Urol. Assoc. J.* 2014; 8 (1-2): e108-e110.
152. Foresta C., Ferlin A., Gianaroli L. et al. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Europ. J. Hum. Genet.* 2002; 10: 303-312.
153. Foresta C., Ferlin A., Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1161-1169.

154. Frints S.G., Fryns J., Lagae L., Syrrou M., Marynen P., Devriendt K. Xp22.3; Yq11.2 chromosome translocation and its clinical manifestations. *Ann. Genet.* 2001; 44 (2): 71-76.
155. Frühmesser A., Kotzot D. Chromosomal variants in Klinefelter syndrome. *Sex. Dev.* 2011; 5 (3): 109-123.
156. Fuqua J.S., McLaughlin J., Perlman E.J. et al. Analysis of the SRY gene in gonadal tissue of subjects with 46,XY gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol.* 1997; 82(2): 701-702.
157. Gabriel-Robez O, Rumpler Y, Ratomponirina C, Petit C, Levilliers J, Croquette MF, Couturier J. Deletion of the pseudoautosomal region and lack of sex-chromosome pairing at pachytene in two infertile men carrying an X;Y translocation. *Cytogenet Cell Genet* 1990;54:38-42.
158. Gall J.G., Pardue M.L. Nucleic acids hybridization to cytological preparations. *Metod. Enzymol.* 1971; 21: 470-480.
159. Gantt P.A., Byrd J.R., Greenblatt R.B. et al. A clinical and cytogenetic study of fifteen patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis. *Fertil. Steril.* 1980; 34: 216-221.
160. Gardner R.J.M., Sutherland G.R. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* - 3rd ed. Oxford University Press, 2004. 577 p.
161. Gardner R.J.M., Sutherland G.R., Shaffer L.G. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* – 4th ed. Oxford University Press, 2012. 634 p.
162. Gerli M., Migliorini G., Bocchini V., Venti G., Ferrarese R., Donti E., Rosi G. A case of complete testicular feminisation and 47,XXY karyotype. *J. Med. Genet.* 1979; 16 (6): 480-483.
163. Giachini C., Laface I., Guarducci E., Balercia G., Forti G., Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Human Genetics* 2008; 124, 399-410.
164. Gigliani F., Gabellini P., Marcucci L., Petrinelli P., Antonelli A. Peculiar mosaicism 47,XYY/48,XYYY/49,XYYYY in man. *J. Genet. Hum.* 1980; 28 (1): 47-51.
165. Giltay J.C., Brunt T., Beemer F.A., Wit J.M., van Amstel H.K., Pearson P.L., Wijmenga C. Polymorphic Detection of a Parthenogenetic Maternal and Double

- Paternal Contribution to a 46,XX/46,XY Hermaphrodite. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62: 937-940.
166. Giltay JC, Kastrop PMM, Tiemessen CHJ, Van Inzen WG, Scheres JMJC, Pearson PL. Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84:67-72.
 167. Gimelli G., Giorda R., Beri S., Gimelli S., Zuffardi O. A 46,X,inv(Y) young woman with gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: cytogenetics, molecular, and methylation studies. *Am. J. Med. Genet. A.* 2006; 140 (1): 40-45.
 168. Giouze M., Williams N.A., Lonie L.J. et al. Protocadherin X/Y, a candidate gene-pair for schizophrenia and schizoaffective disorder: a DHPLC investigation of genomic sequences. *Am. J. Med. Genet. B* 129B; 1-9.
 169. Gisselsson D., Kristofferson U., Giwercman A. Ring Y chromosome in an azoospermic male with short stature: additional evidence for a distinct ring Y syndrome in non-mosaic patients? *Clin. Genet.* 2003; 64 (6): 519-521.
 170. Glantz S.A., *Primer of BIOSTATISTICS (Медико-биологическая статистика)*. 4ed. McGraw-Hill Health Professions Division, М.: изд. Практика, 1999. 459 с.
 171. Golubovsky M.D. Postzygotic diploidization in triploids as a source of unusual cases of mosaicism and twinning. *Hum Reprod* 2003; 18: 236-242.
 172. Gorgojo J.J., Almodovar F., Lopez E., Donnay S. Gonadal agenesis 46,XX associated with the atypical form of Rokitansky syndrome. *Fert. Steril.* 2002; 77 (1): 185-187.
 173. Grass F.S., Brown C.A., Backeljauw P.F. et al. Novel ring chromosome composed of X- and Y-derived material in a girl with manifestations of Ullrich-Turner syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 93 (5): 343-348.
 174. Graves JA. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell.* 2006; 124 (5): 901-914.
 175. Grumbach M.M., Conte F.A. Disorders of sex differentiation, in *Williams Textbook of Endocrinology*, 8th ed., JD Wilson, DW Foster (eds). Philadelphia, Saunders, 1992, pp 853-951.
 176. Hadjkacem-Loukil L., Ghorbel M., Bahloul A., Ayadi H., Ammar-Keskes L. Genetic association between AZF region polymorphism and Klinefelter syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19 (4): 547-551.

177. Hassold T., Arnovitz K., Jacobs P.A., May K., Robinson D. The parental origin of the missing or additional chromosome in 45,X and 47,XXX females. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 1990; 26 (4): 297-304.
178. Hassold T., Jacobs P. Trisomy in man. *Ann. Rev. Genet.* 1984; 18: 69-97.
179. Hawkins J.R., Taylor A., Goodfellow P.N. et al. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete than partial gonadal dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51: 979-984.
180. Hawkins J.R., Taylor A., Berta P. et al. Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum. Genet.* 1992; 88: 471-474.
181. Heinritz W., Kotzot D., Heinze S., Kujat A., Kleemann W.J., Froster U.G. Molecular and cytogenetic characterization of a non-mosaic isodicentric Y chromosome in a patient with Klinefelter syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 2005; 132A (2): 198-201.
182. Henegariu O., Kernek S., Keating M.A., Palmer C.G., Heerema N.A. PCR and FISH analysis of a ring Y chromosome. *Am J Med Genet.* 1997; 69 (2): 171-176.
183. Hersmus R., Kalfa N., de Leeuw B., Stoop H., Oosterhuis J.W., de Krijger R., Wolffenbuttel K.P., Drop S.L., Veitia R.A., Fellous M., Jaubert F., Looijenga L.H. FOXL2 and SOX9 as parameters of female and male gonadal differentiation in patients with various forms of disorders of sex development (DSD). *J. Pathol.* 2008; 215 (1): 31-38.
184. Hopps C.V., Mielnik A., Goldstein M., Palermo G.D., Rosenwaks Z., Schlegel P.N. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 1660-1665.
185. Houk C.P., Hughes I.A., Ahmed F.S., Lee P.A. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. International Intersex Consensus Conference. *Pediatrics.* 2006; 118: 2: P. 753-758.
186. Hsu L.Y. Prenatal diagnosis of 45,X/46,XY mosaicism – a review and update. *Prenat Diagn.* 1989; 9 (1): 31-48.
187. Hsu LY. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am. J. Med. Genet.* 1994; 53 (2): 108-140.
188. Huang WJ, Yen PH. Genetics of spermatogenic failure. *Sex Dev.* 2008;2:251–259.

189. Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A.N., Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet.* 1999; 87 (4): 349-353.
190. Hucklenbroich K., Gromoll J., Heinrich M., et al. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 191-197.
191. Hungerford D.A. Leukocytes cultured from small inocula of the whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Techn.*, 1965; 40: 333-338.
192. Imai A., Horibe S., Fuseya T., Takagi H., Takagi A., Tamaya T. Detection of SRY in 45,X/47,XYY mosaicism leading to phenotypic female. *Clin. Genet.* 1997; 51 (2): 124-126.
193. Inoue H., Nomura M., Yanase T., Ichino I., Goto K., Ikuyama S., Takayanagi R., Nawata H. A rare case of 46,XX true hermaphroditism with hidden mosaicism with sex-determining region Y chromosome-bearing cells in the gonads. *Intern. Med.* 1998; 37(5): 467-471.
194. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Monakhov V.V., Soloviev I.V., Yurov Y.B. Dynamic mosaicism manifesting as loss, gain and rearrangement of an isodicentric Y chromosome in a male child with growth retardation and abnormal external genitalia. *Cytogenet. Genome Res.* 2008; 121 (3-4): 302-306.
195. ISCN 1995. An international system for human cytogenetic nomenclature. Ed. Mitelman F. – *Cytogenetic Cell Genet.* Karger. 1995; 114 pp.
196. ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer L.G., Tommerup N. (eds.). Basel: S. Karger, 2005.
197. ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (eds.). Basel: S. Karger, 2009. 138 p.
198. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. Karger Medical and Scientific Publishers, 2013. Basel: S. Karger, 2009. 140 p.
199. Jäger R.J., Anvret M., Hall K., Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature.* 1990; 348 (6300): 452-454.

200. Jakubowski L., Jeziorowska A., Constantinou M. et al. Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction // *Clin. Genet.* 2000; 57 (4): 291-295.
201. James C., Robson L., Jackson J., Smith A. 46,XY/47,XYY/48,XYYY karyotype in a 3-year-old boy ascertained because of radioulnar synostosis. *Am. J. Med. Genet.* 1995; 56 (4): 389-392.
202. Jaruzelska J., Korcz A., Wojda A., Jedzejczak P., Bierla J., Surmacz T., Pawelczyk L., Page D.C., Kotecki M. Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with Azfc deletion. *J. Med. Genet.* 2001; 38: 798-802.
203. Jehan Z., Vallinayagam S., Tiwari S., Pradhan S., Singh L., Suresh A., Reddy H.M., Ahuja Y.R., Jesudasan R.A. Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Res.* 2007; 17 (4): 433-440.
204. Jiang Y.T., Zhang H.G., Wang R.X., Yu Y., Zhang Z.H., Liu R.Z. Novel Y chromosome breakpoint in an infertile male with a de novo translocation t(Y;16): a case report. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012; 29 (12): 1427-1430.
205. Jiménez A.L., Kofman-Alfaro S., Berumen J., Hernández E., Canto P., Méndez J.P., Zenteno J.C. Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46,XX true hermaphrodite without SRY in leukocytic DNA. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 93 (5): 417-420.
206. Jobling M.A., Lo I.C., Turner D.J. et al. Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16 (3): 307-316.
207. Jobling M.A., Samara V., Pandya A. et al. Recurrent duplication and deletion polymorphism on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5: 1767-1775.
208. Jobling M.A., Williams G.A., Schiebel G.A., Pandya G.A., McElreavey G.A., Salas G.A., Rappold G.A., Affara N.A., Tyler-Smith C. A selective difference between human Y-chromosomal DNA haplotypes. *Curr. Biol.* 1998; 8 (25): 1391-1394.

209. Jorgez C.J., Weedin J.W., Sahin A., Tannour-Louet M., Han S., Bournat J.C., Mielnik A., Cheung S.W., Nangia A.K., Schlegel PN, Lipshultz LI, Lamb DJ. Aberrations in Pseudoautosomal Regions (PARs) Found in Infertile Men with Y-Chromosome Microdeletions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96: E674-9.
210. Josso N., Briard M.-L. Embryonic testicular regression syndrome: variable phenotypic expression in siblings. *J. Pediatr.*, 1980; 97: 200-204.
211. Kaiser P., Gerhard-Ratschow K., Zabel B., Gey W. A new case of XX-male (XX/XXY mosaic). *Hum. Genet.* 1977; 39 (1): 131-137.
212. Kalantari H., Asia S., Totonchi M. et al. Delineating the association between isodicentric chromosome Y and infertility: a retrospective study. *Fertil. Steril.* 2014; 101 (4): 1091-1096.
213. Kamischke A., Gromoll J., Simoni M. et al. Transmission of a Y-chromosomal deletion involving the DAZ and CDY genes from father to son though ICSI. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2320-2322.
214. Kamp C., Hirschmann P., Voss H., Huellen K., Vogt P.H. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2563-2572.
215. Kamp C., Huellen K., Fernandes S., Sousa M., Schlegel P.N., Mielnik A., Kleiman S., Yavetz H., Krause W., Kupker W., Johannisson R., Schulze W., Weidner W., Barros A., Vogt P.H. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 2001; 7 (10): 987-994.
216. Kelly T.E., Franko J.B., Rogol A. et al. Discordant phenotypes and 45,X/46,X,idic(Y). *J. Med. Genet.* 1998; 35: 862-864.
217. Kent-First M.G., Muallem A., Schultz J. et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region - AZFd by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod. Develop.* 1999; 53: 27-41.
218. Khandelwal A., Agarwal A., Jiloha R.C. A 47,XXY female with gender identity disorder. *Arch. Sex. Behav.* 2010; 39 (5): 1021-1023.

219. Kim J.W., Bak C.W., Chin M.U., Cha D.H., Yoon T.K., Shim S.H. SRY-negative 46,XX infertile male with Leydig cell hyperplasia: clinical, cytogenetic, and molecular analysis and review of the literature. *Fertil. Steril.* 2010;
220. Kim J., Kim S.-H., Song J., Choi J. R., Kim H.-S., Lee K.-A. An SRY-deleted XXY female resulting from a paternally inherited t(Y;22). *Ann. Clin. Lab. Science* 2010; 40: 295-299.
221. Kirsch S., Weiss B., De Rosa M. et al. FISH deletion mapping defines a single location for the Y chromosome stature gene, GCY. *J. Med. Genet.* 2000; 37 (8): 593-599.
222. Kirsch S., Weiss B., Miner T.L. et al. Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. *Genome Res.* 2005; 15 (2): 195-204.
223. Kleiman S.E., Bar-Shira Maymon B., Yogev L., Paz G., Yavetz H. The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (3): 399-402.
224. Klein O.D., Backstrand K., Cotter P.D., Marco E., Sherr E., Slavotinek A. Case report: Y;6 translocation with deletion of 6p. *Clin. Dysmorphol.* 2005; 14 (2): 93-96.
225. Klink A., Schiebel K., Winkelmann M., Rao E., Horsthemke B., Lüdecke H.J., Claussen U., Scherer G., Rappold G. The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability. *Hum Mol Genet.* 1995; 4 (5): 869-878.
226. Klinefelter H.F., Reifenstein E.C., Albright F., Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1942; 2 (11): 615-627.
227. Knebel S., Pasantes J.J., Thi D.A.D., Schaller F., Schempp W. Heterogeneity of Pericentric Inversions of the Human Y Chromosome. *Cytogenet. Genome Res.* 2011; 132 (4): 219-226.
228. Kocova M, Siegel SF, Wenger SL, Lee PA, Nalesnik M, Trucco M. Detection of Y chromosome sequences in a 45,X/46,XXq- patient by Southern blot analysis of PCR-amplified DNA and fluorescent in situ hybridization (FISH). *Am J Med Genet.* 1995 Feb 13;55(4):483-8.

229. Kono T., Migita T., Koyama S., Seki I. Another observation of microphthalmia in an XX male: microphthalmia with linear skin defects syndrome without linear skin lesions. *J. Hum. Genet.* 1999; 44: 63-68.
230. Koopman P., Gubbay J., Vivian N. et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991; 351: 117-121.
231. Koopman P., Münsterberg A., Capel B., Vivian N., Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 1990; 348 (6300): 450-452.
232. Koumbaris G., Hatzisevastou-Loukidou H., Alexandrou A., Ioannides M., Christodoulou C., Fitzgerald T., Rajan D., Clayton S., Kitsiou-Tzeli S., Vermeesch J.R., Skordis N., Antoniou P., Kurg A., Georgiou I., Carter N.P., Patsalis P.C. FoSTeS, MMBIR and NAHR at the human proximal Xp region and the mechanisms of human Xq isochromosome formation. *Hum Mol Genet.* 2011; 20 (10): 1925-1936.
233. Krausz C., Degl'Innocenti S., Nuti F., Morelli A., Felici F., Sansone M., Variale G., Forti G. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15: 2673-2681.
234. Krausz C., Giachini C., Xue Y., O'Bryan M.K., Gromoll J., Rajpert-de Meyts E., Oliva R., Akin-Seifer I., Erdei E., Jorgensen N. et al. Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J. Med. Genet.* 2009; 46 (1): 21-31.
235. Krausz C, Chianese C, Lo Giacco D, Tüttelmann F, Ferlin A, Ntostis P, Vinci S, Balercia G, Ars E, Ruiz-Castañé E, Giglio S, Kliesch S, Forti G. Reply: Y-chromosome microdeletions are not associated with SHOX haploinsufficiency. *Hum Reprod.* 2014; 29 (5): 1114-1115.
236. Krausz C., Giachini C., Lo Giacco D., Daguin F., Chianese C., Ars E., Ruiz-Castane E., Forti G., Rossi E. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e44887.
237. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2014; 2 (1): 5-19.

238. Krishna Murthy D.S., Murthy S.K., Patel J.K., Banker G.N., Shah V.C. Inherited pericentric inversion of Y-chromosome with trisomy 21. A case report. *Ann Genet.* 1989; 32 (1): 47-51.
239. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986; 46 (6): 1118-1123.
240. Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Brown L.G., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., Wilson R.K., Silber S., Oates R., Rozen S., Page D.C. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.* 2001; 29 (3): 279-286.
241. Kusz K., Kotecki M., Wojda A., Szarras-Czapnik M., Latos-Bielenska A., Warenik-Szymankiewicz A., Ruszczynska-Wolska A., Jaruzelska J. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. *J. Med. Genet.* 1999; 36 (6): 452-456.
242. Lahn B.T., Ma N., Breg W.R. et al. Xq-Yq interchange resulting in supernormal X-linked gene expression in severely retarded males with 46,XYq- karyotype. *Nat. Genet.* 1994; 8 (3): 243-250.
243. Lahn B.T., Page D.C. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science.* 1997; 278 (5338): 675-680.
244. Lahn B.T., Page D.C. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science.* 1999; 286 (5441): 964-967.
245. Lange J., Skaletsky H., Bell G.W., Page D.C. MSY Breakpoint Mapper, a database of sequence-tagged sites useful in defining naturally occurring deletions in the human Y chromosome. *Nucl. Acid. Res.* 2008; 36 (Database issue): D809-D814. <http://breakpointmapper.wi.mit.edu/mapper.html>
246. Lange J., Skaletsky H., van Daalen et al. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell.* 2009; 138: 855-869.
247. Layman L.C., Tho S.P.T., Clark A. et al. Phenotypic spectrum of 45,X/46,XY males with a ring Y chromosome and bilateral descended testes. *Fertil. Steril.* 2009; 91: 791-797.

248. Le Bourhis, Siffroi C., McElreavey K. et al. Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 688-693.
249. Ledig S., Hiort O., Scherer G., Hoffmann M., Wolff G., Morlot S., Kuechler A., Wieacker P. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Hum. Reprod.* 2010; 25 (10): 2637-2646.
250. Lee Y.H., Kim T., Kim M.H., Kim Y.T., Kim S.H. Y chromosome microdeletions in idiopathic azoospermia and non-mosaic type of Klinefelter syndrome. *Exp. Mol. Med.* 2000; 32 (4): 231-233.
251. Lehrmann K.J., Kovac J.R., Xu J. et al. Isodicentric Yq mosaicism presenting as infertility and maturation arrest without altered SRY and AZF regions. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012; 29: 939-942.
252. Li L., Hamer D.H. Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4 (11): 2013-2016.
253. Li Y., Vilain E., Conte F., Rajpert-De Meyts E., Lau Y.F. Testis-specific protein Y-encoded gene is expressed in early and late stages of gonadoblastoma and testicular carcinoma in situ. *Urol. Oncol.* 2007; 25(2):141-146.
254. Liehr T., Mrasek K., Hinreiner S., Reich D., Ewers E., Bartels I., Seidel J., Emmanuil N., Petesen M., Polityko A., Dufke A., Iourov I., Trifonov V., Vermeesch J., Weise A. Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC) in Patients with a 45,X/46,X,+mar Karyotype – 17 New Cases and a Review of the Literature. *Sex. Dev.* 2007; 1: 353-362.
255. Lim H.N., Berkovitz G.D., Hughes I.A., Hawkins J.R. Mutation analysis of subjects with 46, XX sex reversal and 46, XY gonadal dysgenesis does not support the involvement of SOX3 in testis determination. *Hum. Genet.* 2000; 107 (6): 650-652.
256. Lin L., Achermann J.C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex. Dev.* 2008; 2 (4-5): 200-209.
257. Lin Y.H., Chuang L., Lin Y.M., Lin Y.H., Teng Y.N., Kuo P.L. Isochromosome of Yp in a man with Sertoli-cell-only syndrome. *Fertil Steril.* 2005; 83 (3): 764-746.
258. Lin Y.H., Lin Y.M., Lin Y.H. et al. Ring (Y) in two azoospermic men. *Am. J. Med. Genet.* 2004; 128 (2): 209-213.

259. Lindblom B., Holmlund G. Rapid DNA purification for restriction fragment length polymorphism analysis. *Gene Anal. Techn.* 1988; 5: 97-101.
260. Linden M.G., Bender B.G., Robinson A. Sex chromosome tetrasomy and pentasomy. *Pediatrics.* 1995; 96 (4 Pt 1): 672-682.
261. Lisker R., Ruz L., Mutchinick O. 45,X/47,XYY mosaicism in a patient with Turner's syndrome. *Hum. Genet.* 1978; 41 (2): 231-233.
262. Lissoni S., Baronchelli S., Villa N., Lucchini V., Betri E., Cavalli P., Dalprà L. Chromosome territories, X;Y translocation and Premature Ovarian Failure: is there a relationship? *Mol. Cytogenet.* 2009; 2: 19.
263. Lobaccaro J.M., Medlej R., Berta P., Belon C., Galifer R.B., Guthmann J.P., Chevalier C., Czernichow P., Dumas R., Sultan C. PCR analysis and sequencing of the SRY sex determining gene in four patients with bilateral congenital anorchia. *Clin. Endocrinol (Oxf).* 1993; 38 (2): 197-201.
264. Lo Giacco D., Chianese C., Ars E., Ruiz-Castañé E., Forti G., Krausz C. Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility. *J. Med Genet.* 2014; 51 (5): 340-344.
265. López M., Torres L., Méndez J.P., Cervantes A., Alfaro G., Pérez-Palacios G., Erickson R.P., Kofman-Alfaro S. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am. J. Med. Genet.* 1995; 55 (3): 356-368.
266. Luddi A., Margollicci M., Gambera L., Serafini F., Cioni M., De Leo V., Balestri P., Piomboni P. Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (9): 881-885.
267. Lyon M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961; 190: 372-373.
268. Ma S, Ho Yuen B, Penaherrera M, Koehn D, Ness L, Robinson W. ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation: case report. *Hum Reprod* 2003;18:1377-1382.
269. Machev N., Saut N., Longepied G., Terriou P., Navarro A., Levy N., Guichaoua M., Metzler-Guillemain C., Collignon P., Frances A.M. et al. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J. Med. Genet.* 2004; 41: 814-825.

270. Maciel-Guerra A.T., de Mello M.P., Coeli F.B., Ribeiro M.L., Miranda M.L., Marques-de-Faria A.P., Baptista M.T., Moraes S.G., Guerra-Júnior G. XX Maleness and XX true hermaphroditism in SRY-negative monozygotic twins: additional evidence for a common origin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 93 (2): 339-343.
271. Macville M.V., Loneus W.H., Marcus-Soekarman D., Huys E.H., Schoenmakers E.F., Schrank-Hacker A., Emanuel B.S., Engelen J.J. XX male with sex reversal and a de novo 11;22 translocation. *Am. J. Med. Genet. A.* 2006; 140 (18): 1973-1977.
272. Mademont-Soler I., Morales C., Madrigal I., Margarit E., Bruguera J., Clusellas N., Martínez J.M., Borrell A., Sánchez A., Soler A. Prenatal diagnosis of two different unbalanced forms of an inherited (Y;12) translocation. *Am. J. Med. Genet. A.* 2009; 149A (12): 2820-2823.
273. Malan V., Vekemans M., Turleau C. Chimera and other fertilization errors. *Clin. Genet.* 2006; 70 (5): 363-373.
274. Mancini A., Zollino M., Leone E., Grande G., Festa R., Lecce R., Pontecorvi A., Neri G. A case of 45,X male: genetic reevaluation and hormonal and metabolic follow-up in adult age. *Fertil. Steril.* 2008; 90 (5): 2011.e17-21.
275. Mandel H., Shemer R., Borochowitz Z. U., Okopnik M., Knopf C., Indelman M., Drugan A., Tiosano D., Gershoni-Baruch R., Choder M., Sprecher E. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 82: 39-47.
276. Margarit E., Soler A., Carrió A., Oliva R., Costa D., Vendrell T., Rosell J., Ballesta F. Molecular, cytogenetic, and clinical characterisation of six XX males including one prenatal diagnosis. *J. Med Genet.* 1998; 35 (9): 727-730.
277. Margarit E., Coll M.D., Oliva R., Gomez D., Soler A., Ballesta F. SRY gene transferred to the long arm of the X chromosome in a Y-positive XX true hermaphrodite. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 90: 25-28.
278. Martin R.H., Ko E., Chan K., Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet. Cell. Genet.* – 1993. – Vol. 64, № 1. – P. 23-26.

279. Martin R.H., Rademaker A.W., Reliability of aneuploidy estimates in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two different scoring criteria. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 42: 89-93.
280. Martin R.H., Spriggs E., Rademaker A.W., Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225 846 sperm from 10 normal men. *Biol. Reprod.* 1996; 54 (2): 394-398.
281. Martin R.H., Shi Q., Field L.L. Recombination in the pseudoautosomal region in a 47,XYY male. *Hum. Genet.* 2001; 109 (2): 143-145.
282. Martin R.H. The Clinical Relevance of Sperm Aneuploidy. *The Genetics of Male Infertility*. Carrell D.T. (ed.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007. P. 129-144.
283. Martin R.H., Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 2008a; 16 (4): 523-531.
284. Martin R.H. Cytogenetic determinants of male infertility. *Hum. Reprod. Update.* 2008b; 14 (4): 379-390.
285. Martinerie L., Morel Y., Gay C et al. Impaired puberty, fertility and final stature in 45,X/46,XY gonadal dysgenesis patients raised as boys. *Eur. J. Endocrinol.* 2012; 166: 687-694.
286. Martinez-Pasarell O., Nogues C., Bosch M., Egozcue J., Templado C., Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum. Genet.* 1999; 104 (4): 345-349.
287. Matsuo M., Muroya K., Adachi M., Tachibana K., Asakura Y., Nakagomi Y., Hanaki K., Yokoya S., Yoshizawa A., Igarashi Y., Hanew K., Matsuo N., Ogata T. Clinical and molecular studies in 15 females with ring X chromosomes: implications for r(X) formation and mental development. *Hum. Genet.* 2000; 107 (5): 433-439.
288. Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, Giraud F. X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum Genet* 1982;61:295-309.
289. Matzuk M.M., Lamb D.J. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat. Cell. Biol.* 2002; Suppl. 4: S41-49.
290. McElreavey K., Cortes L.S. X-Y translocations and sex differentiation. *Semin. Reprod. Med.* 2001; 19 (2): 133-139.

291. McElreavey K., Rappaport R., Vilain E., Abbas N., Richaud F., Lortat-Jacob S., Berger R., Le Coniat M., Boucekkine C., Kucheria K. et al. A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum. Genet.* 1992; 90 (1-2): 121-125.
292. McElreavey K., Vilain E., Barbaux S., Fuqua J.S., Fechner P.Y., Souleyreau N., Doco-Fenzy M., McElreavey K.D., Vilain E., Boucekkine C., Vidaud M., Jaubert F., Richaud F., Fellous M. XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics.* 1992; 13 (3): 838-840.
293. Gabriel R., Quereux C., Fellous M., Berkovitz G.D. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93 (16): 8590-8594.
294. Mekkawy M., Kamel A., El-Ruby M. et al. Isodicentric Y chromosomes in Egyptian patients with disorders of sex development (DSD). *Am. J. Med. Genet. A.* 2012; 158A: 1594-1603.
295. Mendonca B.B., Barbosa A.S., Arnhold I.J.P., McElreavey K., Fellous M., Moreira-Filho C.A. Gonadal agenesis in XX and XY sisters: evidence for the involvement of an autosomal gene. *Am. J. Med. Genet.* 1994; 52: 39-43.
296. Minor A., Mohammed F., Farouk A., Hatakeyama C., Johnson K., Chow V., Ma S. Genetic characterization of two 46,XX males without gonadal ambiguities. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25 (11-12): 547-552.
297. Mitra A., Dada R., Kumar R., Gupta N.P., Kucheria K., Gupta S.K. Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Asian J. Androl.* 2006; 8: 81-88.
298. Miura K., Niikawa N. Do monozygotic dizygotic twins increase after pregnancy by assisted reproductive technology? *J Hum Genet.* 2005; 50(1):1-6.
299. Moalem S., Babul-Hirji R., Stavropolous D.J., Wherrett D., Bägli D.J., Thomas P., Chitayat D. XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication. *Am. J. Med. Genet A.* 2012; 158A (7): 1759-1764.
300. Modan-Moses D., Litmanovitch T., Rienstein S., Meyerovitch J., Goldman B., Aviram-Goldring A. True hermaphroditism with ambiguous genitalia due to a

- complicated mosaic karyotype: clinical features, cytogenetic findings, and literature review. *Am. J. Med. Genet. A* 2003; 116: 300-303.
301. Mohandas T.K., Speed R.M., Passage M.B., Yen P.H., Chandley A.C., Shapiro L.J., Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51 (3): 526-533.
302. Monroy N., López M., Cervantes A., García-Cruz D., Zafra G., Canún S., Zenteno J.C., Kofman-Alfaro S. Microsatellite analysis in Turner syndrome: parental origin of X chromosomes and possible mechanism of formation of abnormal chromosomes. *Am. J. Med. Genet.* 2002; 107 (3): 181-189.
303. Morel F., Roux C., Bresson J.L., Sex chromosome aneuploidies in sperm of 47,XYY men. *Arch. Androl.* 1999; 43 (1): 27-36.
304. Muller U., Latt S.A., Donlon T. Y-specific DNA sequences in male patients with 46,XX and 47,XXX karyotypes. *Am. J. Med. Genet.* 1987; 28: 393-401.
305. Müller J., Schwartz M., Skakkebaek N.E. Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 75 (1): 331-333.
306. Müller U., Latt S.A., Donlon T. Y-specific DNA sequences in male patients with 46,XX and 47,XXX karyotypes. *Am. J. Med. Genet.* 1987; 28 (2): 393-401.
307. Muroya K., Kosho T., Ogata T., Matsuo M. Female carriers of Xp22.3 deletion including MRX locus. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 84 (4): 384-385.
308. Murphy K.M., Cohen J.S., Goodrich A. et al. Constitutional duplication of a region of chromosome Yp encoding AMELY, PRKY, and TBL1Y: implications for sex chromosome analysis and bone marrow engraftment analysis. *J. Mol. Diagn.* 2007; 9 (3): 408-413.
309. Naillat F., Prunskaitė-Hyyryläinen R., Pietilä I., Sormunen R., Jokela T., Shan J., Vainio S.J. Wnt4/5a signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19 (8): 1539-1550.

310. Nakagome Y., Seki S., Fukutani K., Nagafuchi S., Nakahori Y., Tamura T. PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet.* 1991; 41 (1): 112-114.
311. Nathanson K.L., Kanetsky P.A., Hawes R., Vaughn D.J., Letrero R., Tucker K., Friedlander M., Phillips K.A., Hogg D., Jewett M.A. et al. The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *J. Hum. Genet.* 2005; 77 (6): 1034-1043.
312. Navarro-Costa P., Plancha C.E., Goncalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 936569.
313. Nazarenko S.A., Timoshevsky V.A., Sukhanova N.N. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turener syndrome patients. *Clin. Genet.* 1999; 56: 59-65.
314. Ng L.K., Kwok Y.K., Tang L.Y., Ng P.P., Ghosh A., Lau E.T., Tang M.H. Prenatal detection of a de novo Yqh-acrocentric translocation. *Clin. Biochem.* 2006; 39 (3): 219-223.
315. Nielsen J, Rasmussen K. Y/autosomal translocations. *Clin Genet.* 1976;9:609–617.
316. Nielsen J., Wohlert M. Sex chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arthus, Denmark. *Children and Young Adults with Sex Chromosome Aneuploidy Birth Defects: Original Article Series.* Evans J.A., Hamerton J.L. (eds.). New York: Wiley-Liss, for the March of Dimes Birth Defects Foundation, 1991; 26: 209-223.
317. Nieschlag E. Classification of andrological disorders. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.* Nieschlag E., Behre H. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1997. P. 81-83.
318. Nieto K., Peña R., Palma I., Dorantes L.M., Eraña L., Alvarez R., García-Cavazos R., Kofman-Alfaro S., Queipo G. 45,X/47,XXX/47,XX, del(Y)(p?)/46,XX mosaicism causing true hermaphroditism. *Am. J. Med. Genet. A.* 2004; 130A (3): 311-314.
319. Niu D.M., Pan C.C., Lin C.Y., Hwang B., Chung M.Y. Mosaic or chimera? Revisiting an old hypothesis about the cause of the 46,XX/46,XY hermaphrodite. *J Pediatr.* 2002; 140 (6): 732-735.

320. Nucaro A.L., Melis P., Casini M.R., Rossino R., Cau M., Melis M.A., Loche S. Turner syndrome mosaicism: an unusual case with a de novo large dicentric marker chromosome: mos 45,X/46,X,ter rea(X;X)(p22.3;p22.3). *J. Appl. Genet.* 2008; 49 (3): 301-303.
321. Numabe H., Nagafuchi S., Nakahori Y., Tamura T., Kiuchi H., Namiki M., Kohda N., Fukushima Y., Fuse H., Kusano M. et al. DNA analyses of XX and XX-hypospadiac males. *Hum Genet.* 1992; 90(3): 211-214.
322. Oates R.D., Silber S., Brown L.G., Page D.C. Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 2813-2824.
323. Ogata T., Goodfellow P., Petit C., Aya M., Matsuo N. Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J. Med. Genet.* 1992; 29 (7): 455-459.
324. Ogata T., Matsuo M., Muroya K., Koyama Y., Fukutani K. 47,XXX male: a clinical and molecular study. *Am. J. Med. Genet. A* 2001; 98: 353-356.
325. Ogata T., Matsuo N., Shimizu N. A ring X chromosome, 46,Y,r(X)(p22.33q28), as a cause of extreme short stature in a male. *Am. J. Med. Genet.* 1990; 35 (2): 241-244.
326. Ogata T., Tyler-Smith C., Purvis-Smith S. et al. Chromosomal localisation of a gene(s) for Turner stigmata on Yp. *J. Med Genet.* 1993; 30 (11): 918-922.
327. Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer Books, Berlin, 1967.
328. Okamoto I., Otte A., Allis C., Reinberg D., Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004; 303 (5658): 644-649.
329. Osipova G.R., Karmanov M.E., Kozlova S.I., Evgrafov O.V. PCR detection of Y-specific sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome: clinical implications and limitations. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 76 (4): 283-287.
330. Page D.C., Bieker K., Brown L.G., Hinton S., Leppert M., Lalouel J.M., Lathrop M., Nystrom-Lahti M., de la Chapelle A., White R., Linkage, physical mapping, and DNA sequence analysis of pseudoautosomal loci on the human X and Y chromosomes. *Genomics.* 1987; 1 (3): 243-256.

331. Page D.C., Brown L.G., de la Chapelle A. Exchange of terminal portions of X- and Y-chromosomal short arms in human XX males. *Nature*. 1987; 328 (6129): 437-440.
332. Page D.C., Harper M.E., Love J. et al. Occurrence of a transposition from the X-chromosome long arm to the Y-chromosome short arm during human evolution. *Nature*. 1984; 311:119-123.
333. Page D.C., Silber S., Brown L.G. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum. Reprod*. 1999; 14: 1722-1726.
334. Palka C., Alfonsi M., Morizio E., Soranno A., La Rovere D., Matarrelli B., Rullo A.L., Zori R., Chiarelli F., Calabrese G. Array-CGH characterization of a prenatally detected de novo 46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.3;q11.2) in a male fetus. *Eur J Med Genet*. 2011; 54 (3): 333-336.
335. Palka G., Dallapiccola B. 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 RBM1 and DAZ genes. *Am. J. Hum. Genet*. 1996; 59: 1393-1395.
336. Pardue ML, Gall JG. Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. *Methods Cell Biol*. 1975;10:1-16.
337. Parisi M.A., Kletter G.B., Grady R., Mitchell M., Ramsdell L.A., Pagon R.A. Micropenis with testicular regression, low LH levels, and poor androgen and HCG responses: a distinct syndrome? *Am J Med Genet*. 2002;109(4):271-277.
338. Pasantes J.J., Wimmer R., Knebel S., Münch C., Kelbova C., Junge A., Kieback P., Küpferling P., Schempp W. 47,X,idic(Y),inv dup(Y): a non-mosaic case of a phenotypically normal boy with two different Y isochromosomes and neocentromere formation. *Cytogenet. Genome Res*. 2012; 136 (2): 157-162.
339. Patsalis P.C., Skordis N., Sismani C. et al. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am. J. Med. Genet*. 2005; 135 (2): 145-149.
340. Perrin A., Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Keromnes G, Langlois ML, Barrière P, Amice J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Segregation of chromosomes in

- sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: case report. *Hum Reprod.* 2008; 23(1):227-30.
341. Perrin A., Vialard F, Douet-Guilbert N, Gomes DM, Guthauser B, De Braekeleer M, Selva J, Morel F. Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction // *Reprod Biomed Online.* 2009 Jun;18(6):850-855.
342. Petit C., Levilliers J., Rouyer F., Simmler M.C., Herouin E., Weissenbach J. Isolation of sequences from Xp22.3 and deletion mapping using sex chromosome rearrangements from human X-Y interchange sex reversals. *Genomics.* 1990; 6 (4): 651-658.
343. Petit C., de la Chapelle A., Levilliers J., Castillo S., Noel B., Weissenbach J. An abnormal terminal X-Y interchange accounts for most but not all cases of human XX maleness. *Cell.* 1987; 49: 595-602.
344. Petrusevska R., Beudt U., Schäfer D., Schneider M., Brude E., Leitner C., Heller K., Arnemann J. Distribution of marker-Y chromosome containing cells in different tissues of a Turner mosaic patient with mixed gonadal dysgenesis. *Clin. Genet.* 1996; 49 (5): 261-266.
345. Pettenati M.J., Wheeler M., Bartlett D.J, Subrt I, Rao N., Kroovand RL, Burton BK, Kahler S, Park HK, Cospers P, et al. 45,X/47,XYY mosaicism: clinical discrepancy between prenatally and postnatally diagnosed cases. *Am. J. Med. Genet.* 1991; 39 (1): 42-47.
346. Philibert P., Bignon-Laubert A., Rouzier R., Pienkowski C., Paris F., Konrad D., Schoenle E., Sultan C. Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and müllerian duct abnormalities: a French collaborative study. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2008; 93: 895-900.
347. Philibert P., Zenaty D., Lin L., Soskin S, Audran F., Léger J., Achermann J.C., Sultan C. Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. *Hum Reprod.* 2007; 22 (12): 3255-3261.
348. Pinho M.J., Neves R., Costa P., Ferrás C., Sousa M., Alves C., Almeida C., Fernandes S., Silva J., Ferrás L., Barros A. Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal

- translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: a case report. *Hum. Reprod.* 2005; 20 (3): 689-696.
349. Polanco J.C., Wilhelm D., Davidson T.L., Knight D., Koopman P. Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19 (3): 506-516. Polani P.E. Pairing of X and Y chromosomes, non-inactivation of X-linked genes, and the maleness factor. *Hum. Genet.* 1982; 60 (3): 207-211.
350. Poplinski A., Wieacker P., Kliesch S., Gromoll J. Severe XIST hypomethylation clearly distinguishes (SRY+) 46,XX-maleness from Klinefelter syndrome. *Eur. J Endocrinol.* 2010; 162 (1): 169-175.
351. Powell C.M. Sex Chromosomes, Sex Chromosome Disorders, and Disorders of Sex Development / Gersen S.L., Keagle M.B. (eds.), *The Principles of Clinical Cytogenetics*, Third Edition, Springer Science+Business Media New York 2013. pp. 175-211.
352. Prader A. Der genitalbefund beim Pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms. Morphologie, Häufigkeit, Entwicklung und Vererbung der verschiedenen Genitalformen. *Helv. Paediatr. Acta.* 1954; 9: 231-248.
353. Queipo G., Zenteno J.C., Peña R., Nieto K., Radillo A., Dorantes L.M., Eraña L., Lieberman E., Söderlund D., Jiménez A.L., Ramón G., Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum. Genet.* 2002; 111 (3): 278-283.
354. Queralt R., Madrigal I., Vallecillos M.A., Morales C., Ballescá J.L., Oliva R., Soler A., Sánchez A., Margarit E. Atypical XX male with the SRY gene located at the long arm of chromosome 1 and a 1qter microdeletion. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008; 146A (10): 1335-1340.
355. Quilter C.R., Karcanias A.C., Bagga M.R. et al. Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF). *Hum. Reprod.* 2010; 25 (8): 2139-2150.

356. Quilter C.R., Nathwani N., Conway G.S. et al. A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex. *J. Med Genet.* 2002; 39: 12. e80.
357. Quilter C.R., Taylor K., Conway G.S. et al. Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann. Hum. Genet.* 1998; 62: 99-106.
358. Ragg S., Härle M., Scherthan H. Analysis of sex chromosome distribution in the gonadal tissue of a 45,X/47,XYY mosaic by fluorescence in situ hybridization. *Mod. Pathol.* 1995; 8 (3): 295-298.
359. Raygorodskaya N.Y., Chernykh V.B., Morozov D.A., Olutoye O.O., Bolotova N.V., Averyanov A.P., Maslyakova G.N., Shilova N.V., Zolotukhina T.V. A 3-year-old boy with ovotestes: gender reassignment and surgical management // *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24(7-8):587-589.
360. Rajender S., Rajani V., Gupta N.J., Chakravarty B., Singh L., Thangaraj K. SRY-negative 46,XX male with normal genitals, complete masculinization and infertility. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12 (5): 341-346.
361. Ramos E.S., Moreira-Filho C.A., Vicente Y.A., Llorach-Velludo M.A., Tucci S.Jr, Duarte M.H., Araújo A.G., Martelli L. SRY-negative true hermaphrodites and an XX male in two generations of the same family. *Hum Genet.* 1996; 97 (5): 596-598.
362. Randolph L.M. *The Cytogenetics of Infertility*/ Gersen S.L., Keagle M.B. (eds.), *The Principles of Clinical Cytogenetics, Third Edition*, Springer Science+Business Media New York 2013. pp. 175-211.
363. Rao E., Weiss B., Fukami M. et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.* 1997; 16 (1): 54-63.
364. Rappold G.A., *The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes.* *Hum. Genet.* 1993; 92 (4): 315-324.
365. Rappold G.A., Klink A., Weiss B. et al. Double crossover in the human Xp/Yp pseudoautosomal region and its bearing on interference. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3 (8): 1337-1340.

366. Ravel C., Chantot-Bastarud S., El Houate B. et al. GR/GR deletions within the azoospermia factor c region on the Y chromosome might not be associated with spermatogenic failure. *Fertil. Steril.* 2006; 85 (1): 229-231.
367. Ravel C., Siffroi J.P. Y chromosome abnormalities and Turner's syndrome. *Ginecol. Obstet. Fertil.* 2009; 37: 511-518.
368. Reddy K.S., Schwartz G.E., Jamedhor M. A fertile XY/XX chimeric male with chronic myeloid leukemia in a minor 46,XX cell line and a history of polycythemia vera and trisomy 9 in the major 46,XY cell line. *Leuk. Lymphoma.* 2009; 50 (8): 1375-1380.
369. Reddy K.S., Sulcova V. Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. *Cytogenet. Cell Genetics.* 1998; 82: 52-57.
370. Refai O., Friedman A., Terry L., Jewett T., Pearlman A., Perle M.A., Ostrer H. De novo 12;17 translocation upstream of SOX9 resulting in 46,XX testicular disorder of sex development. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010; 152A (2): 422-426.
371. Reijo R., Lee T.Y., Salo P. et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet.* 1995; 10: 383-393.
372. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(4):906-922.
373. Repping S., Skaletsky H., Brown L., van Daalen S.K., Korver C.M., Pyntikova T., Kuroda-Kawaguchi T., de Vries J.W., Oates R.D, Silber S. et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat. Genet.* 2003; 35: 247-251.
374. Repping S., van Daalen S.K., Brown L.G., Korver C.M., Lange J., Marszalek J.D., Pyntikova T., van der Veen F, Skaletsky H., Page D.C. et al. High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat. Genet.* 2006; 38 (4): 463-467.
375. Repping S., van Daalen S.K., Korver C.M., Brown L.G., Marszalek J.D., Gianotten J., Oates R.D., Silber S., van der Veen F. et al. A family of human Y

- chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 2004; 83(6): 1046-1052.
376. Rivera H., Gutierrez-Angulo M., Gomez-Sanchez H. et al. True vs. false inv(Y)(p11q11.2): a familial instance concurrent with trisomy 21. *Ann. Genet.* 2002 ; 45 (2) : 63-65.
 377. Rivera H., Solé M.T., García-Cruz D., Martínez-Wilson M., Cantú J.M. On telomere replication and fusion in eukaryotes: apropos of a case of 45,X/46,X,terrea(X;X)(p22.3;p22.3). *Cytogenet. Cell Genet.* 1984; 38 (1): 23-28.
 378. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. (1992). *Human Cytogenetics: A Practical Approach. Vol. 1, Constitutional Analysis* (2nd edn, Oxford University Press). 274p.
 379. Rosenberg C., Frota-Pessoa O., Vianna-Morgante A.M., Chu T.H. Phenotypic spectrum of 45,X/46,XY individuals. *Am. J. Med. Genet.* 1987; 27 (3): 553-559.
 380. Rosenberg C., Mustacchi Z., Braz A., Arnhold I. J. P., Chu T. H., Carnevale J., Frota-Pessoa O. Testicular regression in a patient with virilized female phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 1984; 19: 183-188.
 381. Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J. et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature.* 2005; 434 (7031): 325-337.
 382. Ross N.L., Yang J., Sargent C.A., Boucher C.A., Nanko S., Wadekar R., Williams N.A., Affara N.A., Crow T.J. Triplication of several PAR1 genes and part of the Homo sapiens specific Yp11.2/Xq21.3 region of homology in a 46,X,t(X;Y)(p22.33;p11.2) male with schizophrenia. *J. Med. Genet.* 2001; 38 (10): 710-719.
 383. Rosser Z.H., Balaesque P., Jobling M.A. Gene conversion between the X chromosome and the male-specific region of the Y chromosome at a translocation hotspot. *Am. J. Hum. Genet.* 2009; 85 (1): 130-134.
 384. Röttger S., Pasantes J., Baldermann C., Reichl E., Yen P., Hansmann I., Schempp W. Familial mosaicism of del(Y) and inv del(Y). *Cytogenet. Cell Genet.* 2000; 91 (1-4): 208-211.
 385. Röttger S., Schiebel K., Senger G., Ebner S., Schempp W., Scherer G. An SRY-negative 47,XXY mother and daughter. *Cytogenet. Cell Genet.* 2000; 91 (1-4): 204-207.

386. Rozen S., Skaletsky H., Marszalek J.D., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., Wilson R.K., Page D.C. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*. 2003; 423 (6942): 873-876.
387. Rubes J., Vozdova M., Robbins W.A., Rezacova O., Perreault S.D., Wyrobek A.J. Stable variants of sperm aneuploidy among healthy men show associations between germinal and somatic aneuploidy // *Am J Hum Genet*. 2002; 70 (6): 1507-1519.
388. Saavedra-Castillo E., Cortes-Gutierrez E.I., Davila-Rodriguez M.I., Reyes-Martinez M.E., Oliveros-Rodriguez A. 47,XXY female with testicular feminization and positive SRY: a case report. *J. Reprod. Med*. 2005; 50 (2): 138-140.
389. Sahval A.R. Mixed gonadal dysgenesis: a variety of hermaphroditism. *Am. J. Hum. Genet*. 1963; 15: 155.
390. Salas-Cortés L., Jaubert F., Nihoul-Feketé C., Brauner R., Roseblatt M., Fellous M. SRY protein is expressed in ovotestis and streak gonads from human sex-reversal. *Cytogenet. Cell Genet*. 2000; 91 (1-4): 212-216.
391. Samli H., Samli M.M., Azgoz A., Solak M. Y chromosome microdeletion in a case with Klinefelter's Syndrome. *Arch. Androl*. 2006; 52 (6): 427-431.
392. Sargent C.A., Boucher C.A., Kirsch, S. et al. The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *J. Med. Genet*. 1999; 36: 670-677.
393. Sarto G.E., Opitz J.M. The XY gonadal agenesis syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 1973; 10: 288-293.
394. Saxena R., De Vries J.W.A., Repping S., Alagappan R.K., Skaletsky H., Brown L.G., Ma P., Chen E., Hoovers J.M.N., Page D.C. Four DAZ Genes in Two Clusters Found in the AZFc Region of the Human Y Chromosome. *Genomics* 2000; 67 (3): 256-267.
395. Schaub R.L., Reveles X.T., Baillargeon J., Leach R.J., Cody J.D. Molecular characterization of 18p deletions: evidence for a breakpoint cluster. *Genet. Med*. 2002; 4 (1): 15-19.

396. Schempp W., Müller G., Scherer G., Bohlander S.K., Rommerskirch W., Fraccaro M., Wolf U. Localization of Y chromosome sequences and X chromosomal replication studies in XX males. *Hum. Genet.* 1989; 81 (2): 144-148.
397. Scherer G., Schempp W., Fraccaro M., Bausch E., Bigozzi V., Maraschio P., Montali E., Simoni G., Wolf U. Analysis of two 47,XXX males reveals X-Y interchange and maternal or paternal nondisjunction. *Hum. Genet.* 1989; 81 (3): 247-251.
398. Scherer G., Schempp W., Fraccaro M., Bausch E., Bigozzi V. Analysis of two 47,XXX males reveals X-Y interchange and maternal or paternal nondisjunction. *Hum. Genet.* 1989; 81: 247-251.
399. Schiebel K., Winkelmann M., Mertz A., Xu X., Page D.C., Weil D., Petit C., Rappold G.A. Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6 (11): 1985-1989.
400. Schinzel A. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations In Man* (2nd ed). Berlin & New York: Walter de Gruyter; 2001. 966p.
401. Schmid M., Guttenbach M., Enders H., Terruhn V. A 47,XXY female with unusual genitalia. *Hum. Genet.* 1992; 90 (4): 346-349.
402. Schoenle E., Schmid W., Schinzel A., Mahler M., Ritter M., Schenker T., Metaxas M. et al. 46,XX/46,XY chimerism in a phenotypically normal man. *Hum. Genet.* 1983; 64: 86-89.
403. Sciurano R.B., Luna Hisano C.V., Rahn M.I., Brugo Olmedo S., Rey Valzacchi G., Coco R., Solari A.J., Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. *Hum. Reprod.* 2009; 24 (9): 2353-2360.
404. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971; 2 (7731): 971-972.
405. Seeherunvong T., Perera E.M., Bao Y., Benke P.J., Benigno A., Donahue R.P., Berkovitz G.D. 46,XX sex reversal with partial duplication of chromosome arm 22q. *Am. J. Med. Genet. A.* 2004; 127A (2): 149-151.
406. Shahid M., Dhillon V.S., Khalil H.S., Haque S., Batra S., Husain S.A., Looijenga L.H. A SRY-HMG box frame shift mutation inherited from a mosaic father with a

- mild form of testicular dysgenesis syndrome in Turner syndrome patient. *BMC Med. Genet.* 2010; 11: 131.
407. Shapiro L.R., Pettersen R.O., Wilmot P.L., Warburton D., Benn P.A., Hsu L.Y. Pericentric inversion of the Y chromosome and prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* 1984; 4 (6): 463-465.
408. Sharp A., Kusz K., Jaruzelska J., Szarras-Czapnik M., Wolski J., Jacobs P. Familial X/Y translocations associated with variable sexual phenotype. *J. Med. Genet.* 2004; 41 (6): 440-444.
409. Sharp A., Kusz K., Jaruzelska J., Tapper W., Szarras-Czapnik M., Wolski J., Jacobs P. Variability of sexual phenotype in 46,XX(SRY+) patients: the influence of spreading X inactivation versus position effects. *J. Med. Genet.* 2005; 42 (5): 420-427.
410. Sheth F., Ewers E., Kosyakova N., Weise A, Sheth J., Patil S., Ziegler M., Liehr T. A neocentric isochromosome Yp present as additional small supernumerary marker chromosome-evidence against U-type exchange mechanism? *Cytogenet. Genome Res.* 2009; 125 (2): 115-116.
411. Shi Y.C., Cui Y.X., Zhou Y.C., Wei L., Jiang H.T., Xia X.Y., Lu H.Y., Wang H.Y., Shang X.J., Zhu W.M., Li X.J., Huang Y.F. A rare Y chromosome constitutional rearrangement: a partial AZFb deletion and duplication within chromosome Yp in an infertile man with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Int. J. Androl.* 2011; 34 (5 Pt 1): 461-469.
412. Shriparna S., Denniff M., Jeffreys A.J., Neumann R., Artigas M.S., Veselis A., May C.A. A major recombination hotspot in the XqYq pseudoautosomal region gives new insight into processing of human gene conversion events // *Human Molecular Genetics.* 2012; 21 (9): 2029-2038.
413. Siffroi J.P., Le Bourhis C., Krausz C., Barboux S., Quintana-Murci L., Kanafani S., Rouba H., Bujan L., Bourrouillou G., Seifer I., Boucher D., Fellous M., McElreavey K., Dadoune J.P. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum. Reprod.* 2000; 15 (12): 2559-2562.
414. Simmler M.C., Rouyer F., Vergnaud G., Nystrom-Lahti M., Ngo K.Y., de la Chapelle A., Weissenbach J., Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature.* 1985; 317 (6037): 692-697.

415. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (3): 402-409.
416. Simoni M., Bakker E., Eurlings M., Matthijs G., Moro E., Müller C.R., Vogt P.H. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion. *Int. J. Androl.* 1999; 22: 292-299.
417. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int. J. Androl.* 2004; 27: 240-249.
418. Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990; 346 (6281): 240-244.
419. Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L, Brown L.G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003; 423 (6942): 825-837.
420. Skordis N.A., Stetka D.G., MacGillivray M.H., Greenfield S.P. Familial 46,XX males coexisting with familial 46,XX true hermaphrodites in same pedigree. *J. Pediatr.* 1987; 110 (2): 244-248.
421. Slaney S.F., Chalmers I.J., Affara N.A., Chitty L.S. An autosomal or X linked mutation results in true hermaphrodites and 46,XX males in the same family. *J. Med. Genet.* 1998; 35 (1): 17-22.
422. Sparkes R.S., Muller H.M., Veomett I.C. Inherited pericentric inversion of a human Y chromosome in trisomic Down's syndrome. *J. Med. Genet.* 1970; 7 (1): 59-62.
423. Stankiewicz P., Helias-Rodzewicz Z., Jakubow-Durska K. et al. Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 101 (1): 20-25.
424. Stemkens D., Broekmans F.J., Kastrop P.M., Hochstenbach R., Smith B.G., Giltay J.C. Variant Klinefelter syndrome 47,X,i(X)(q10),Y and normal 46,XY karyotype in monozygotic adult twins. *Am. J. Med. Genet A.* 2007;143A(16): 1906-1911.

425. Stevanović M., Lovell-Badge R., Collignon J., Goodfellow P.N. SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 2 (12): 2013-2018.
426. Stouffs K., Tournaye H., Van der Elst J., Haentjens P., Liebaers I., Lissens W. Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting? *Hum. Reprod.* 2008; 23 (5): 1193-1199.
427. Strain L., Warner J.P., Johnston T., Bonthron D.T. A human parthenogenetic chimaera. *Nat. Genet.* 1995; 11: 164-169.
428. Stratton R.F., Walter C.A., Paulgar B.R., Price M.E., Moore C.M. Second 46,XX male with MLS syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 76 (1): 37-41.
429. Stuppia L., Calabrese G., Borrelli P. et al. Loss of the SHOX gene associated with Leri-Weill dyschondrosteosis in a 45,X male. *J. Med. Genet.* 1999; 36: 711-713.
430. Stuppia L., Calabrese G., Franchi G.P. et al. Molecular studies in three patients with isodicentric Y chromosome. *Hum. Genet.* 1996; 98: 691-695.
431. Sun C., Skaletsky H., Birren B. et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet.* 1999; 23: 429-432.
432. Sun C., Skaletsky H., Rozen S., Gromoll J., Nieschlag E., Oates R., Page D.C. Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2291-2296.
433. Sutton E., Hughes J., White S., Sekido R., Tan J., Arboleda V., Rogers N, Knower K., Rowley L., Eyre H., Rizzoti K., McAninch D., Goncalves J., Slee J., Turbitt E., Bruno D., Bengtsson H., Harley V., Vilain E., Sinclair A., Lovell-Badge R., Thomas P. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest.* 2011; 121(1): 328-334.
434. Svingen T., Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Gen. Dev.* 2013; 27: 2409-2426.
435. Swain A., Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev.* 1999; 13: 755-767.
436. Swyer G.I. Male pseudohermaphroditism: a hitherto undescribed form. *Br. Med J.* 1955; 2 (4941): 709-712.
437. Sybert V.P., McCauley E. Turner's Syndrome. *NEJM.* 2004; 351: 1227-1238.

438. Tachon G., Lefort G., Puechberty J., Schneider A., Jeandel C., Boulot P., Prodhomme O., Meyer P., Taviaux S., Touitou I., Pellestor F., Geneviève D., Gatinois V. Discordant sex in monozygotic XXY/XX twins: a case report. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (12): 2814-2820.
439. Takagi A., Imai A., Tamaya T. A novel sex-determining region on Y (SRY) nonsense mutation identified in a 45,X/47,XYY female. *Fertil. Steril.* 1999; 72 (1): 167-169.
440. Tanner J.M., Whitehouse R.H., Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child.* 1966; 41 (219): 454-471.
441. Tartaglia N., Davis S., Hench A., Nimishakavi S., Beauregard R., Reynolds A., Fenton L., Albrecht L., Ross J., Visootsak J., Hansen R., Hagerman R. A new look at XYY syndrome: medical and psychological features. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008; 146A (12): 1509-1522.
442. Telvi L., Lebbar A., Del Pino O. et al. 45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases. *Pediatrics* 1999; 104: 304-308.
443. Temel S.G., Gulden T., Yakut T., Saglam H., Kilic N., Bausch E., Jin W.J., Leipoldt M., Scherer G. Extended pedigree with multiple cases of XX sex reversal in the absence of SRY and of a mutation at the SOX9 locus. *Sex Dev.* 2007; 1 (1): 24-34.
444. Templado C, Márquez C, Munné S, Colls P, Martorell MR, Cieply K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;74(3):194-200.
445. Tar A., Sólyom J., Györfári B., Ion A., Telvi L., Barboux S., Souleyreau N., Vilain E., Fellous M., McElreavey K. Testicular development in an SRY-negative 46,XX individual harboring a distal Xp deletion. *Hum. Genet.* 1995; 96 (4): 464-468.
446. Thangaraj K., Gupta N.J., Chakravarty B., Singh L. A 47,XXY female. *Lancet.* 1998; 352 (9134): 1121.
447. Thomas N.S., Hassold T.J. Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod. Update.* 2003; 9 (4): 309-317.

448. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet* 1976; 34: 119-124.
449. Tilford C.A., Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Rozen S., Brown L.G., Rosenberg M., McPherson J.D., Wylie K., Sekhon M., Kucaba T.A., Waterston R.H., Page D.C. A physical map of the human Y chromosome. *Nature*. 2001; 409 (6822): 943-945.
450. Thomas N.S., Collins A.R., Hassold T.J., Jacobs P.A. A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47, XXY males of paternal origin. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; 8 (10): 805-808.
451. Thomas N.S., Ennis S., Sharp A.J., Durkie M., Hassold T.J., Collins A.R., Jacobs P.A. Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10 (3): 243-250.
452. Tsuchiya K., Reijo R., Page D.C., Disteche C.M. Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57: 1400-1407.
453. Trombetta B., Cruciani F., Underhill P.A., Sellitto D., Scozzari R. Footprints of X-to-Y Gene Conversion in Recent Human Evolution. *Mol. Biol. Evolution* 2010; 27 (3): 714-725.
454. Tuck-Muller C.M., Chen H., Martínez J.E., Shen C.C., Li S., Kusyk C., Batista D.A., Bhatnagar Y.M., Dowling E., Wertelecki W. Isodicentric Y chromosome: cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. *Hum Genet.* 1995; 96 (1):119-129.
455. Turner B., Fechner P.Y., Fuqua J.S., Marcantonio S.M., Perlman E.J., Vordermark J.S., Berkovitz G.D. Combined Leydig cell and Sertoli cell dysfunction in 46,XX males lacking the sex determining region Y gene. *Am. J. Med. Genet.* 1995; 57 (3): 440-443.
456. Tüttelmann F., Gromoll J. Novel genetic aspects of Klinefelter's syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 2010; 16 (6): 386-395.
457. Sugawara N., Tokunaga Y., Maeda M., Komaba R., Araki Y. A successful pregnancy outcome using frozen testicular sperm from a chimeric infertile male

- with a 46,XX/46,XY karyotype: Case report. *Hum. Reprod.* 2005; 20 (1): 147-148.
458. Uehara S., Tamura M., Nata M., Kanetake J., Hashiyada M., Terada Y., Yaegashi N., Funato T., Yajima A. Complete androgen insensitivity in a 47,XXY patient with uniparental disomy for the X chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 86 (2): 107-111.
459. Uehara S., Nata M., Nagae M., Sagisaka K., Okamura K., Yajima A. Molecular biologic analyses of tetragametic chimerism in a true hermaphrodite with 46,XX/46,XY. *Fertil. Steril.* 1995; 63:189-192.
460. Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N., McMahon A. P. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397: 405-409.
461. Valetto A., Bertini V., Rapalini E., Simi P. A 46,XX SRY-negative man with complete virilization and infertility as the main anomaly. *Fertil. Steril.* 2005; 83 (1): 216-219.
462. van den Berg C., Van Opstal D., Brandenburg H., Los F.J. Case of 45,X/46,XY mosaicism with non-mosaic discordance between short-term villi (45,X) and cultured villi (46,XY). *Am J Med Genet.* 2000; 93 (3): 230-3.
463. van den Veyver I.B. Microphthalmia with linear skin defects (MLS), Aicardi, and Goltz syndromes: are they related X-linked dominant male-lethal disorders? *Cytogenet. Genome Res.* 2002; 99:289-296.
464. van Dijk B.A., Boomsma D.I., de Man A.J. Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *Am J Med Genet.* 1996; 61: 264-268.
465. Van Esch H., Hollanders K., Badisco L., Melotte C., Van Hummelen P., Vermeesch J.R., Devriendt K., Fryns J.P., Marynen P., Froyen G. Deletion of VCX-A due to NAHR plays a major role in the occurrence of mental retardation in patients with X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 (13): 1795-1803.
466. Van Niekerk W.A., Retief A.E. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum. Genet.* 1981; 58 (1): 117-122.
467. Veerappa A., Padakannaya P., Ramachandra N.B. Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-transposed region (XTR) in the Y chromosome. *Funct. Integr. Genomics* 2013; 13 (3): 285-293.

468. Velissariou V., Christopoulou S., Karadimas C., Pihos I., Kanaka-Gantenbein C., Kapranos N., Kallipolitis G., Hatzaki A. Rare XXY/XX mosaicism in a phenotypic male with Klinefelter syndrome: case report. *Eur. J. Med. Genet.* 2006; 49 (4): 331-337.
469. Velissariou V., Antoniadis T., Patsalis P., Christopoulou S., Hatzipoulou A., Donoghue J., Bakou K., Kaminopetros P., Athanassiou V., Petersen M.B. Prenatal diagnosis of two rare de novo structural aberrations of the Y chromosome: cytogenetic and molecular analysis. *Prenat. Diagn.* 2001; 21 (6): 484-487.
470. Venkataraman G., Craft I., Triple-Y syndrome following ICSI treatment in a couple with normal chromosomes. *Hum. Reprod.* 2002; 17 (10): 2560-2563.
471. Vergnaud G., Page D.C., Simmler M.C., Brown L., Rouyer F., Noel B., Botstein D., de la Chapelle A., Weissenbach J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* 1986; 38 (2): 109-124.
472. Verma R.S., Rodriguez J., Dosik H. The clinical significance of pericentric inversion of the human Y chromosome: a rare "third" type of heteromorphism. *J. Hered.* 1982; 73 (3): 236-238.
473. Verma R.S., Gogineni S.K., Kleyman S.M., Conte R.A. Characterisation of a satellited non-fluorescent Y chromosome (Y[nfqs]) by FISH. *J. Med Genet.* 1997;34(10):817-818.
474. Vernole P., Terrinoni A., Didona B., De Laurenzi V., Rossi P., Melino G., Grimaldi P. An SRY-negative XX male with Huriez syndrome. *Clin. Genet.* 2000. Jan; 57 (1): 61-66.
475. Vetro A., Ciccone .R, Giorda R., Patricelli M.G., Della Mina E., Forlino A., Zuffardi O. XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. *J. Med. Genet.* 2011; 48 (10): 710-712.
476. Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G., Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 2001; 28 (3): 216-217.
477. Vilain E., Le Fiblec B., Morichon-Delvallez N., Brauner R., Dommergues M., Dumez Y., Jaubert F., Boucekkine C., McElreavey K., Vekemans M. et al. SRY-negative XX fetus with complete male phenotype. *Lancet.* 1994;343(8891):240-241.

478. Vilain E., McElreavey K., Jaubert F., Raymond J.P., Richaud F., Fellous M. Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50 (5): 1008-1011.
479. Vialard F., Molina-Gomes D., Roume J., Podbiol A., Hirel C., Bailly M., Hammoud I., Dupont J.M., de Mazancourt P., Selva J. Case report: Meiotic segregation in spermatozoa of a 46,X,t(Y;10)(q11.2;p15.2) fertile translocation carrier // *Reprod Biomed Online.* – 2009. - 18 (4): P. 549-554.
480. Vinci G., Anjot M.N., Trivin C., Lottmann H., Brauner R., McElreavey K. An analysis of the genetic factors involved in testicular descent in a cohort of 14 male patients with anorchia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89 (12): 6282-6285.
481. Vinci G., Raicu F., Popa L., Popa O., Cocos R., McElreavey K. A deletion of a novel heat shock gene on the Y chromosome associated with azoospermia. *Mol Hum. Reprod* 2005; 11(4): 295-298.
482. Vodicka R., Vrtel R., Dusek L., Singh A.R., Krizova K., Svacinova V., Horinova V., Dostal J., Oborna I., Brezinova J., Sobek A., Santavy J. TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod. Biomed. Online.* 2007; 14 (5): 579-587.
483. Vogt P.H. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Hum. Reprod. Update* 2005a; 11 (4): 319-336.
484. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online* 2005b; 10: 81-93.
485. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kiesewetter F., Köhn F.M., Schill W.B., Farah S., Ramos C. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5: 933-943.
486. Vollrath D., Foote S., Hilton A., Brown L.G., Beer-Romero P., Bogan J.S., Page D.C. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258 (5079): 52-59.
487. Vorona E., Zitzmann M., Gromoll J., Schüring A.N., Nieschlag E. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared

- with 47,XXY Klinefelter patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92 (9): 3458-3465.
488. Vozdova M., Horinova V., Wernerova V., Skalikova R., Rybar R., Prinosilova P., Oracova E., Rubes J., Der(4)t(Y;4): Three-generation transmission and sperm meiotic segregation analysis. *Am. J. Med. Genet.* 2011a; 155A (5): 1157-1161.
489. Wahlström J. Y/Y translocations and their cytologic and clinical manifestations. Sanberg A.A. (ed.). "The Y chromosome, Part B: Clinical aspects of Y chromosome abnormalities". New York: Alan R Liss Inc., P. 207-212.
490. Wang I., Weil D., Levilliers J., Affara N.A., de la Chapelle A., Petit C. Prevalence and molecular analysis of two hot spots for ectopic recombination leading to XX maleness. *Genomics.* 1995; 28 (1): 52-58.
491. Weil D., Portnoi M.F., Levilliers J., Wang I., Mathieu M., Taillemite J.L., Meier M., Boudailliez B., Petit C. A 45,X male with an X;Y translocation: implications for the mapping of the genes responsible for Turner syndrome and X-linked chondrodysplasia punctata. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2 (11): 1853-1856.
492. Weil D., Wang I., Dietrich A., Poustka A., Weissenbach J., Petit C. Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombinations leading to XX maleness. *Nat. Genet.* 1994; 7 (3): 414-419.
493. Weissenbach J., Levilliers J., Petit C. et al. Normal and abnormal interchanges between the human X and Y chromosomes. *Development* 1987; 101 (Suppl.): 67-74.
494. Wiland E., Yatsenko A.N., Kishore A., Stanczak H., Zdarta A., Ligaj M., Olszewska M., Wolski J.K., Kurpisz M. FISH and array CGH characterization of de novo derivative Y chromosome (Yq duplication and partial Yp deletion) in an azoospermic male *Reprod Biomed Online.* 2015 May 7. pii: S1472-6483(15)00206-0.
495. Williams B.J., Ballenger C.A., Malter H.E., Bishop F., Tucker M., Zwingman T.A., Hassold T.J., Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2 (11): 1929-1936.

496. Williams N.A., Close J., Giouzelli M. et al. Accelerated evolution of Protocadherin 11X/Y: a candidate gene-pair for cerebral asymmetry and language. *Am. J. Med. Genet. B* 2006; 141B (6); 623-33.
497. Wimmer R., Schempp W., Gopinath P.M., Nagarajappa C.S., Chandra N., Palaniappan I., Hansmann I. A family case of fertile human 45,X,psu dic(15;Y) males. *Cytogen. Genome Res.* 2006; 115 (1): 94-98.
498. Wit J.M., Quartero A.O., Bax N.M., Huber J. A phenotypic male with true hermaphroditism and a 46,XX/46,XY/47,XXY karyotype. *Clin Genet.* 1987; 31 (4): 243-248.
499. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. - Cambridge: Cambr. Univ. Press 1999. - 143 p. // Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. Четвертое издание. Cambridge University Press, 1999. Пер. с англ. Р.А. Нерсесяна. Научн. ред. перевода проф. Л.Ф. Курило М., 2001.143 с.
500. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen, 5th ed. - Cambridge: Cambr. Univ. Press 2010. - 272 p.
501. Wohlfahrt-Veje C., Main K.M., Skakkebaek N.E. Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2009; 71 (4): 459-465.
502. Wong E.C., Ferguson K.A., Chow V., Ma S., Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum. Reprod.* 2008; 23 (2): 374-378.
503. Worley K.C., Lindsay E.A., Bailey W., Wise J., McCabe E.R., Baldini A. Rapid molecular cytogenetic analysis of X-chromosomal microdeletions: fluorescence in situ hybridization (FISH) for complex glycerol kinase deficiency. *Am J Med Genet.* 1995; 57 (4): 615-619.
504. Yatsenko A.N., Yatsenko S.A., Weedon J.W., Lawrence A.E., Patel A., Peacock S., Matzuk M.M., Lamb D.J., Cheung S.W., Lipshultz L.I., Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. *J. Urol.* 2010; 183 (4): 1636-1642.

505. Yen P.H., Li X.M., Tsai S.P. et al. Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell* 1990; 61: 603-610.
506. Yen P.H., Tsai S.P., Wenger S.L. et al. X/Y translocations resulting from recombination between homologous sequences on Xp and Yq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88 (20): 8944-8948.
507. Yogev L., Segal S., Zeharia E., Gamzu R., Maymon B.B., Paz G., Botchan A., Hauser R., Yavetz H., Kleiman S.E. Sex chromosome alignment at meiosis of azoospermic men with azoospermic factor microdeletion. *J. Androl.* 2004; 25(1): 110-116.
508. Zarate Y.A., Dwivedi A., Bartel F.O. et al. 7,XY,+der(Y),t(X;Y)(p21.1;p11.2): a unique case of XY sex reversal. *Am. J. Med. Genet.* 2011; 155: 386-391.
509. Zenteno J.C., López M., Vera C., Méndez J.P., Kofman-Alfaro S. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Genet.* 1997; 100 (5-6): 606-610.
510. Zenteno J.C., Jiménez A.L., Canto P., Valdéz H., Méndez J.P., Kofman-Alfaro S. Clinical expression and SRY gene analysis in XY subjects lacking gonadal tissue. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 99 (3): 244-247.
511. Zhang F., Lu C., Li Z., Xie P., Xia Y., Zhu X., Wu B., Cai X., Wang X., Qian J. et al. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J. Med. Genet.* 2007; 44 (7): 437-444.
512. Zinn A.R., Ramos P., Elder F.F., Kowal K., Samango-Sprouse C., Ross J.L. Androgen receptor CAGn repeat length influences phenotype of 47,XXY (Klinefelter) syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90 (9): 5041-5046.
513. Zuffardi O., Bonaglia M., Ciccone R., Giorda R. Inverted duplications deletions: underdiagnosed rearrangements? *Clin. Genet.* 2009; 75 (6): 505-513.

Приложение

Стадии полового созревания у здоровых мальчиков по Таннеру.

Стадия	Наружные половые органы	Оволосение на лобке	Другие проявления
I	Наружные гениталии (половой член, яички и мошонка) имеют детское строение	Отсутствует	Начало процесса ускорения роста (в среднем с 10,5 лет)
II	Увеличение размеров яичек и мошонки. Начало пигментации кожи мошонки.	Рост редких прямых, слабо пигментированных волос у основания полового члена.	Возрастание темпов роста. Увеличение запасов жира и развития мускулатуры. Увеличение и пигментация околососковых ареол.
III	Дальнейшее увеличение размеров яичек, мошонки, рост в длину полового члена.	Волосы темнеют, начинают завиваться, распространяются за пределы лонного сочленения.	Увеличение массы тела, ширины плеч. Транзиторная гинекомастия. Рост гортани, сопряженный с мутацией голоса.
IV	Увеличение размеров полового члена, его окружности и головки. Полная пигментация кожи.	Лобковое оволосение приближается к взрослому типу. Жесткие курчавые волосы, но их количество меньше, чем у взрослых.	Максимальный темп роста (14 лет). Рост волос в подмышечных впадинах, на верхней губе и подбородке. Интенсивный рост сальных желез на лице. Первые спонтанные эякуляции. Низкий голос.
V	Взрослый тип строения наружных половых органов. По размеру и форме соответствуют половозрелым.	Лобковое оволосение по взрослому типу, распространяется на внутреннюю поверхность бедер.	Обратное развитие гинекомастии. Рост волос на всем лице. Замедление темпов роста (к 17,5 годам).

Стадии полового созревания у здоровых девочек по Таннеру.

Стадия	Молочные железы	Оволосение на лобке	Другие проявления
I	Железы неразвиты	Отсутствует	Детский тип строения гениталий. Увеличение размеров яичников.
II	Железа приподнята над поверхностью грудной клетки, околососковая зона увеличена в диаметре	Рост редких прямых, слабо пигментированных волос на медиальной поверхности половых губ	Увеличение темпа роста, накопление и перераспределения жира; увеличение диаметра таза; формирование телосложения по женскому типу
III	Дальнейшее увеличение железы и околососковой зоны без разделения их контуров	Волосы темнеют, начинают завиваться, распространяются за пределы лонного сочленения	Пубертатный максимум темпов роста (12 лет). Паполочка Додерлейна в вагинальном секрете, pH 4-5.
IV	Дальнейший рост грудных желез, соска. Сосок и околососковая область образуют вторичный бугорок над контуром железы	Жесткие, курчавые волосы, но их количество меньше, чем у взрослых	Рост волос в подмышечных впадинах. Менархе, начало овуляций (10,5-15 лет)
V	Железы развиты полностью, околососковая зона составляет часть общего контура железы	Оволосение по взрослому типу (в форме феминного треугольника), распространяется на медиальную поверхность бедер	Снижение темпа роста к 16 годам. Регулярные овуляции (через 2 года от начала менархе)

Приложение 3 (Табл. 3).

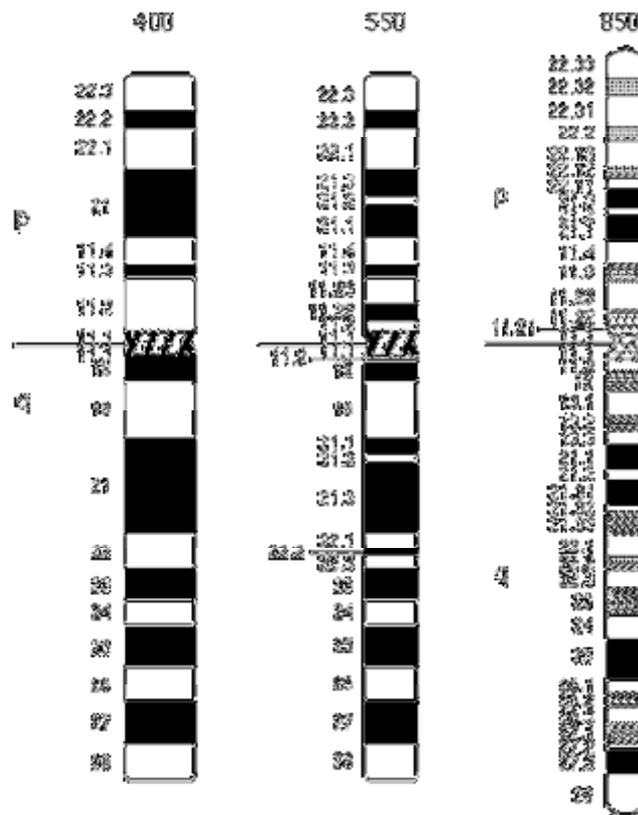
Нормативные значения показателей эякулята согласно критериям ВОЗ (WHO, Laboratory manual for examination of human semen, 1999; 2010).

Параметры	Нормальные показатели	
	норма ВОЗ 1999г.	норма ВОЗ 2010г.
Объем эякулята	2,0 – 5,0 мл.	1,5 – 5,0 мл.
Вязкость	≤ 20 мм	≤ 20 мм
pH	7,2 - 7,8	7,2 - 7,8
Срок разжижения	≤ 60 мин.	≤ 60 мин.
Концентрация сперматозоидов в 1 мл	≥ 20 x 10 ⁶	≥ 15 x 10 ⁶
Категории подвижности:	50% и более подвижных (категории 'a' + 'b')	40% и более подвижных (категории 'PR' + 'NP')
Быстрое поступательное движение – категория 'a'	≥ 25%	категория 'PR' прогрессивно поступательное движение ≥ 32%
Медленное поступательное движение – категория 'b'	≥ 25%	
Непоступательное движение – категория 'c'	≤ 50% и менее категории 'c' + 'd'	Непрогрессивно подвижные – категория 'NP'
Неподвижные – категория 'd'		Неподвижные – категория 'IM' (категория 'd')
Живые сперматозоиды	≥ 50%	≥ 58%
Морфологически нормальные сперматозоиды	≥ 30%	≥ 4%
Количество лейкоцитов	Менее 1 x 10 ⁶ в мл	Менее 1 x 10 ⁶ в мл

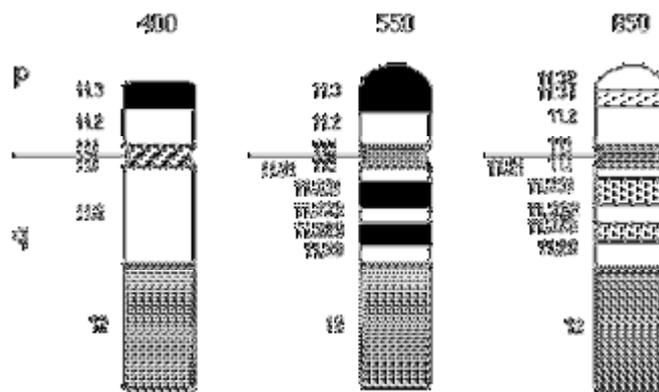
Приложение 4 (Табл. 4).

Классификация спермиологических ‘диагнозов’ (ВОЗ, 1999; 2010).

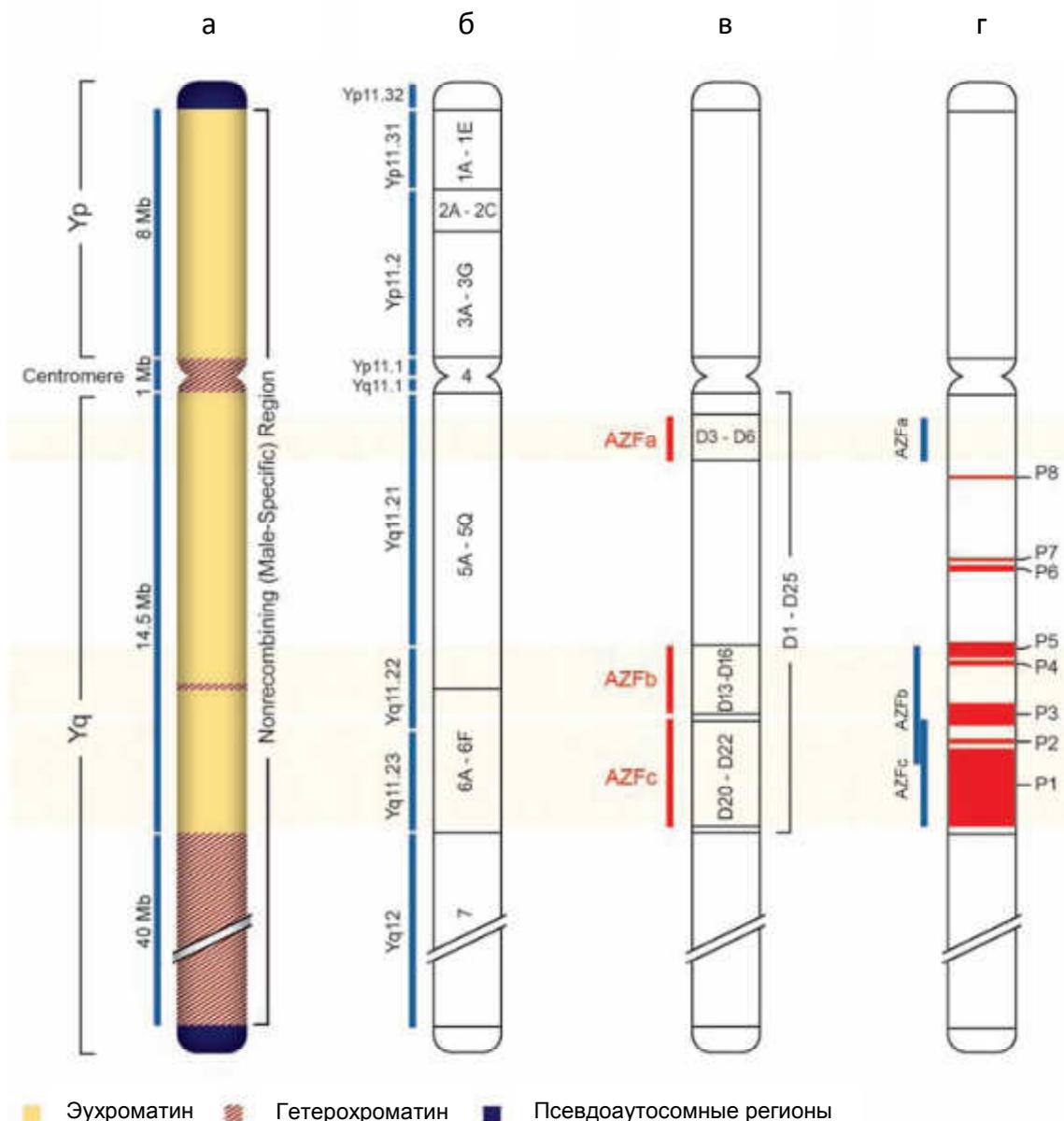
Спермиологический диагноз	Критерии ВОЗ 1999г.	Критерии ВОЗ 2010г.
Нормозооспермия	Количество (концентрация) сперматозоидов в эякуляте ≥ 20 млн/мл, подвижных – $\geq 50\%$ (при характеристике движения ‘a’ + ‘b’), сперматозоидов нормальной формы $\geq 30\%$.	Количество (концентрация) сперматозоидов в эякуляте ≥ 15 млн/мл, подвижных – $\geq 40\%$ (при характеристике движения ‘PR’ + ‘NP’), сперматозоидов нормальной формы $\geq 4\%$.
Азооспермия	Отсутствие сперматозоидов, при наличии эякулята	Отсутствие сперматозоидов, при наличии эякулята
Олигозооспермия	Количество (концентрация) сперматозоидов в эякуляте менее 20 млн/мл	Количество (концентрация) сперматозоидов в эякуляте менее 15 млн/мл
Тератозооспермия	Количество сперматозоидов нормальной формы в эякуляте менее 30% при концентрации сперматозоидов ≥ 20 млн/мл	Количество сперматозоидов нормальной формы в эякуляте менее 4% при концентрации сперматозоидов ≥ 15 млн/мл
Астенозооспермия	Количество (концентрация) сперматозоидов в эякуляте ≥ 20 млн/мл, подвижность: - быстрое, линейное движение менее 25%; - ‘a’ + ‘b’ – слабое, линейное или нелинейное (‘c’) менее 50%	Количество (концентрация) сперматозоидов в эякуляте ≥ 15 млн/мл: - прогрессивно подвижные ‘PR’ $\geq 32\%$; непрогрессивно подвижные ‘NP’; - общая подвижность ‘PR’ + ‘NP’ $\geq 40\%$
Олигоспермия	Объем эякулята больше 0 мл, но менее 2 мл	Объем эякулята больше 0 мл, но менее 1,5 мл
Аспермия	Отсутствие эякулята	Отсутствие эякулята



Приложение 5 (Рис. 1). Идиограммы X-хромосомы человека (разрешение 400, 550 и 850 бэндов) из руководства ISCN (1995).



Приложение 6 (Рис. 2). Идиограммы Y-хромосомы человека (разрешение 400, 550 и 850 бэндов) из руководства ISCN (1995).



Приложение 7 (Рис. 3). Различные карты Y-хромосомы человека.

Примечание: Слева направо: а) общая структура Y-хромосомы человека, ее короткого плеча (Yp) и длинного плеча (Yq) с указанием размеров эухроматиновых и гетерохроматиновых областей, а также нерекombинирующей области (NRY) – MSY регион; б) карта делеционных интервалов Y- по Vollrath et al. (1992) с указанием локусов; в) карта регионов AZF локуса по Vogt et al. (1996) с указанием делеционных интервалов Y-хромосомы человека в соответствующих регионах (AZFa – D3-D6, AZFb – D13-D16 и AZFc – D20-D22); г) карта регионов AZF локуса и карта палиндромов Y-хромосомы человека (P1-P8) по Skaletsky et al. (2003).

ДНК маркеры, использованные для молекулярного анализа последовательностей
хромосом X и Y.

Маркер	Локус	Регион MSY / ген
sY14 (<i>SRY</i>)	Yp11.3	Ген <i>SRY</i>
ZFX/ZFY	Xp22.11/ Yp11.3	Гены <i>ZFX</i> и <i>ZFY</i>
sY2062	Yp11.3	X-дегенерирующая область
sY1248	Yp11.3	<i>XTR</i>
TGIF2LY-1	Yp11.2	<i>XTR/TGIF2LY</i>
TGIF2LY-2	Yp11.2	<i>XTR/TGIF2LY</i>
sY211	Yp11.2	<i>XTR</i>
PCHDH11Y	Yp11.2	<i>XTR/PCHDH11Y</i>
sY1240	Yp11.2	<i>XTR/PCHDH11Y</i>
sY716	Yp11.2	<i>XTR/PCHDH11Y</i>
sY1241	Yp11.2	Ампликонный участок Yp11.2
sY1209	Yp11.2	Ампликонный участок Yp11.2
sY1219	Yp11.2	Ампликонный участок Yp11.2
<i>AMEX/AMELY</i>	Xp22.3/Yp11.2	Ген <i>AMELX</i> и его псевдоген – <i>AMELY</i>
sY82	Yq11.21	проксимальная граница региона AZFa
sY83	Yq11.21	проксимальная граница региона AZFa
sY84	Yq11.21	Регион AZFa
sY86	Yq11.21	Регион AZFa
sY87	Yq11.21	Регион AZFa
USP9Y	Yq11.21	Регион AZFa
sY1316	Yq11.21	Регион AZFa
DBY1	Yq11.21	Регион AZFa
DBY2	Yq11.21	Регион AZFa
sY1234	Yq11.21	Регион AZFa
sY615	Yq11.21	Регион AZFa
sY88	Yq11.21	дистальная граница региона AZFa
sY182 (<i>KALY</i>)	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb/ псевдоген X-сцепленного гена <i>KALI</i>
sY151	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb
sY94	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb
sY95	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb
sY98	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb
sY102	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb
sY106	Yq11.21	Область между регионами AZFa и AZFb

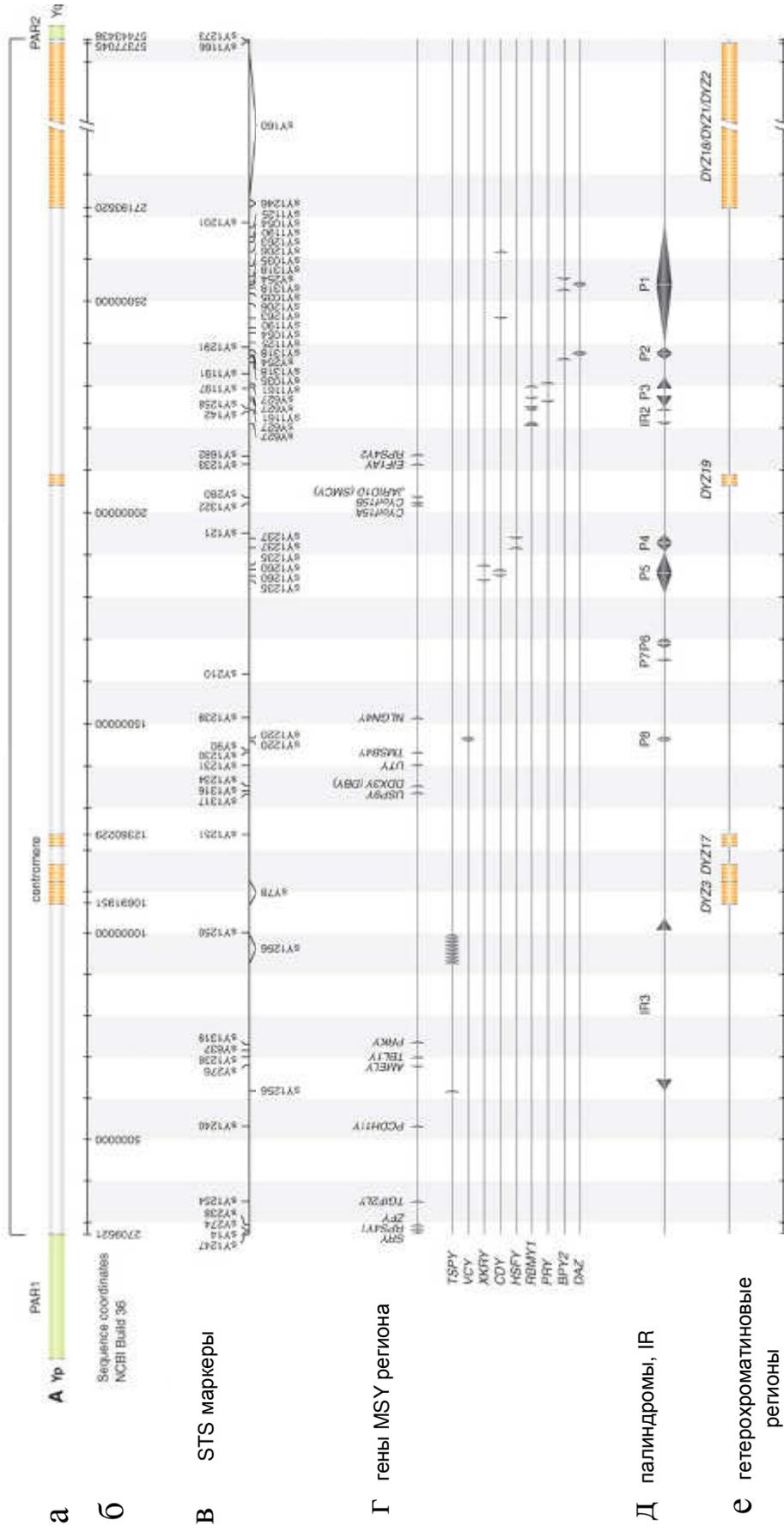
Маркер	Локус	Регион MSY / ген
sY1264	Yq11.22	проксимальная граница региона AZFb
sY1235	Yq11.22	проксимальная граница региона AZFb
sY1237	Yq11.22	Регион AZFb
sY121	Yq11.22	Регион AZFb
sY124	Yq11.22	Регион AZFb
sY127	Yq11.22	Регион AZFb
sY134	Yq11.22	Регион AZFb
sY135	Yq11.223	Регион AZFb
sY142	Yq11.23	Регион AZFb/проксимальная граница региона AZFc
sY143	Yq11.23	Регион AZFb/проксимальная граница региона AZFc
sY1197	Yq11.23	Регион AZFb/проксимальная граница региона AZFc
sY1192	Yq11.23	Регион AZFb/проксимальная граница региона AZFc
sY254	Yq11.23	Регион AZFc (DAZ)
sY255	Yq11.23	Регион AZFc (DAZ)
sY1291	Yq11.23	Регион AZFc
sY1206	Yq11.23	Регион AZFc
sY1054	Yq11.23	Регион AZFc
sY152	Yq11.23	Регион AZFc
sY242	Yq11.23	Регион AZFc
sY157	Yq11.23	дистальная граница региона AZFc
sY158	Yq11.23	дистальная граница региона AZFc
sY1125	Yq11.23	дистальная граница региона AZFc
sY160	Yq12	Гетерохроматиновый регион Yq12

Палиндромы MSY региона Y-хромосомы человека.

Палиндром	Длина плеча, т.п.н.	Идентичность последователь ностей плеч, %	Длина спейсера, т.п.н.	Протяженность палиндрома, т.п.н.
P1	1450	99,97	2,1	2902
P1.1*	9,9	99,95	3,9	24
P1.2*	9,9	99,95	3,9	24
P2	122	99,97	2,1	246
P3	283	99,94	170	736
P4	190	99,98	40	419
P5	496	99,98	3,5	996
P6	110	99,97	46	266
P7	8,7	99,97	12,6	30
P8	36	99,997	3,4	75
Общая протяженность палиндромов, т.п.н.				5670

Примечание: * - палиндромы P1.1 и P1.2 располагаются в дистальном и проксимальном плечах палиндрома P1, соответственно.

MSY регион



Приложение 10 (Рис. 4). Карта Y-хромосомы человека, с указанием ее регионов, карты STS маркеров, положения генов и палиндромов [Lange et al., 2008].

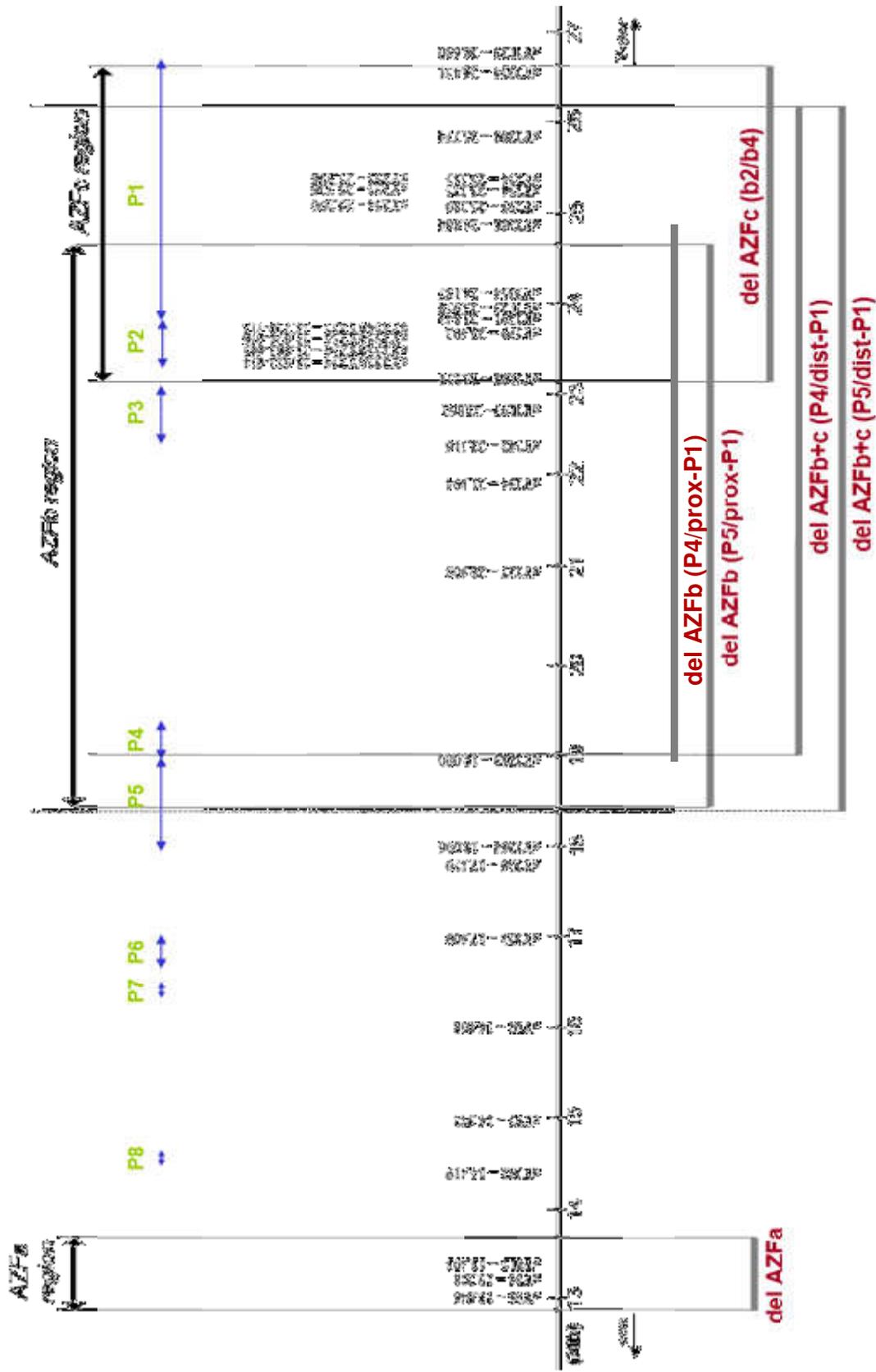
Примечание: Структура хромосомы Y человека с указанием MSY и псевдоаутосомных (PAR1, PAR2) регионов (а), шкала размерности согласно базе данных NCBI (б). Карта STS-маркеров (в), однокопийных генов и копий мульткопийных генов (г). Положение палиндромов (P1-P8) и повторов IR (д) и гетерохроматиновых участков MSY региона (е).

Приложение 11 (Табл. 7).

Гены, транскрибируемые последовательности в регионе AZFc и прилегающих палиндромах.

Символ гена/ транскрип- ционной единицы	Название гена	Количество транскриби- руемых копий в Y палиндромах	Количество транскриби- руемых копий в регионе AZFc	Наличие транскриби- руемых копий вне палиндромов Y	Наличие псевдогенов в палиндро- мах Y	Наличие псевдогенов вне палиндромов Y	Кол-во экзонов	Наиболее протяженная открытая рамка считывания, ОРС (а.о.)
<i>RBMY1</i>	<i>RNA binding motif Y isoform 1</i>	4	0	да	да	да	12	496
<i>BPY2</i>	<i>Basic protein Y 2</i>	3	3	нет	да	да	7	106
<i>DAZ (DAZ1 - DAZ4)</i>	<i>Deleted in azoospermia, isoforms 1 - 4</i>	4	4	нет	нет	нет	20-28	486-744
<i>CDY1</i>	<i>Chromo- domain Y isoform 1</i>	2	2	нет	да	да	2	554
<i>PRY</i>	<i>PTP-BL related Y</i>	2	0	нет	да	да	5	147
<i>CSPG4LY</i>	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 4 like Y</i>	2	2	нет	нет	нет	2	230
<i>GOLGA2LY</i>	<i>Golgi autoantigen, golgin subfamily a 2 like Y</i>	2	2	нет	нет	нет	10	184
<i>TTY3</i>	<i>Testis transcript Y 3</i>	2	2	нет	нет	да	3	26
<i>TTY4</i>	<i>Testis transcript Y 4</i>	3	3	нет	нет	да	4	45
<i>TTY5</i>	<i>Testis transcript Y 5</i>	1	0	нет	да	да	2	75
<i>TTY6</i>	<i>Testis transcript Y 6</i>	2	0	нет	нет	да	3	95
Всего:		27	18					

Примечания: ОРС – открытая рамка считывания, а.о. – аминокислотных остатка, UTR (Untranslated Region) – нетранслируемый регион.



Приложение 12 (Рис. 5). Карта STS маркеров локуса AZF Y-хромосомы человека, использованных в исследовании. Сверху указаны AZF регионы (черными стрелками) и палиндромы P1-P8 (синими стрелками), ниже - маркеров с указанием шкалы расстояния и их положения от Ypter (м.п.н./Mb), внизу – наиболее частые типы делеций AZF регионов.

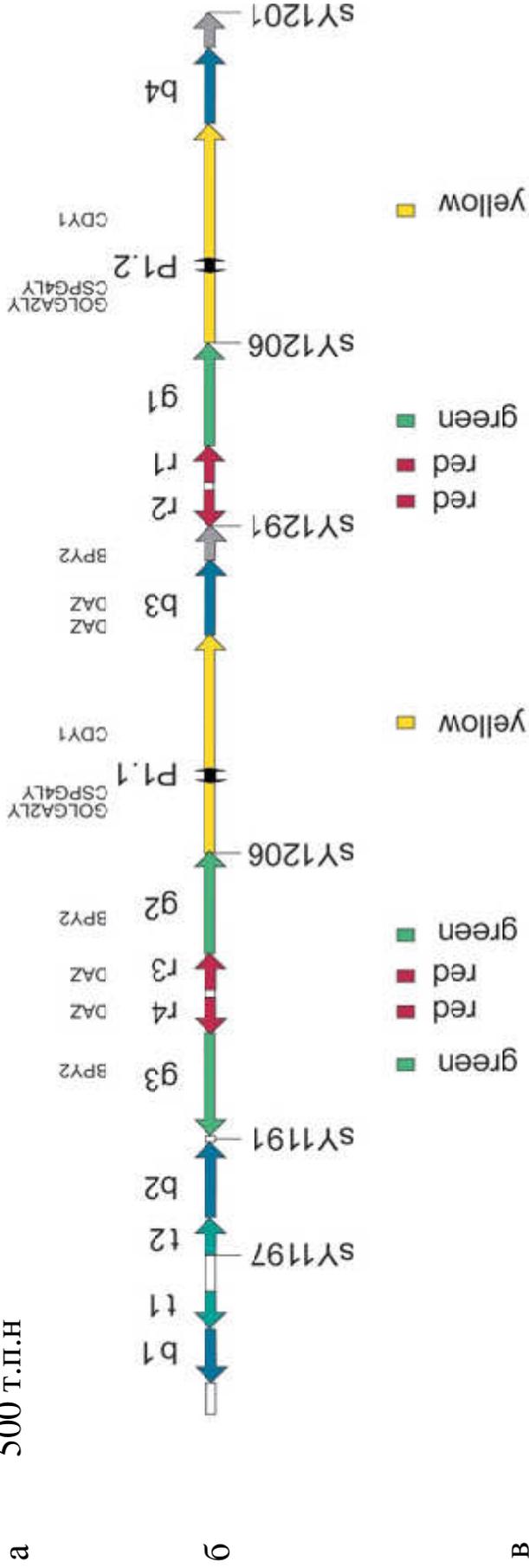
Приложение 13 (Табл. 8).

Характеристика различных типов делеций AZFc региона Y-хромосомы по наличию STS-локусов, размеру делеции числу утраченных и сохраненных генов.

Делеция	Наличие STS локусов						Всего утраченных генов	Число присутствующих копий генов и транскрипционных единиц	Размер делеции
	sY142	sY1197	sY1192	sY1291	sY1206	sY1125			
P3a, P3b, P3c	+/-	-	+/-	+	+	+	6-9	23-26	1,0-1,3 м.п.н.
P3d	+	-	+	+	+	+	1	31	0,03 м.п.н.
b1/b3	+	-	-	-	+	+	12	20	1,6 м.п.н.
b2/b3 (g1/g3)	+	+	-	+	+	+	12	20	1,8 (2,2) м.п.н.
gr/gr	+	+	+	-	+	+	9	23	1,6 м.п.н.
b2/b4 ("классическая" AZFc)	+	+	-	-	-	+	21	11	3,5 м.п.н.
Нет делеций (референсная Y-хромосома)	+	+	+	+	+	+	-	32	-

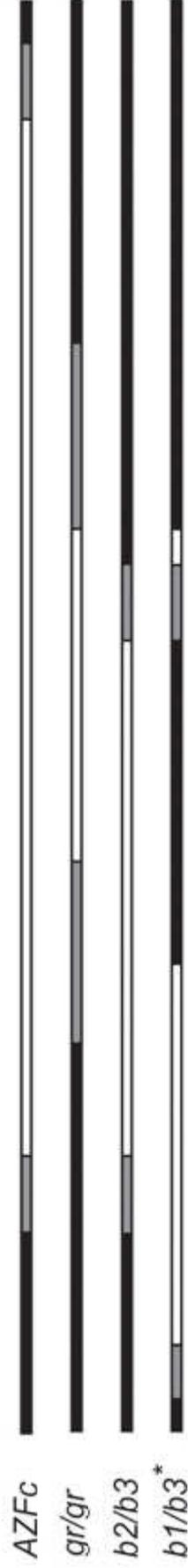


а 500 т.п.н



б

Делеции



Приложение 14 (Рис. 6). Карта ампликонов и генов AZFc региона Y-хромосомы человека. Ампликоны показаны стрелками разного цвета согласно Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Сверху приведена шкала размерности (500 т.п.н.). Внизу показаны основные типы делеций AZFc региона (полюя AZF(b2/b4) и частичных – gr/gr, b2/b3 b1/b3). Черными полосами показаны присутствующие фрагменты, белыми полосами – отсутствующие участки, серыми полосами – области Y-хромосомы, наличие которых точно не определено.

Приложение 15. (Таблица 9).

Типы делеции локуса AZF и характерные для них формы патозооспермии у мужчин-носителей.

Тип делеций	Обозначение делеции	Характерные формы патозоосперии	Характерные гистологические типы нарушения сперматогенеза	Возможность получения сперматозоидов для ЭКО/ICSI (в том числе с помощью биопсии)	Прогноз в отношении репродукции/возможность сохранения фертильности
‘Классические’ (полные) делеции AZF-локуса					
AZFa	AZFa	Азооспермия	Синдром «только клетки Сертоли»	Отсутствует	Неблагоприятный
AZFb	P5/proximal P1, P4/proximal P1	Азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени	Блок сперматогенеза на допахитенных стадиях	Возможно в редких случаях	Чаше неблагоприятный
AZFc	b2/b4	Азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени, редко среднетяжелой степени (количество сперматозоидов <10 млн/мл)	Различные, от сниженной активности сперматогенеза до синдрома «только клетки Сертоли»	Возможно, в том числе при азооспермии (50-60% случаев)	В случае получения сперматозоидов возможно ЭКО/ICSI. Описаны редкие случаи сохранения фертильности при олигозооспермии.
AZFa+b	AZFa+b	Азооспермия	Синдром «только клетки Сертоли»	Отсутствует	Неблагоприятный
AZFb+c	P5/distal P1, P4/distal P1	Азооспермия, редко – олигозооспермия тяжелой степени (количество сперматозоидов <1 млн/мл)	Синдром «только клетки Сертоли» (в большинстве случаев)	Очень редко	В большинстве случаев благоприятный. Описаны единичные успешные случаи ЭКО/ICSI
AZFa+c	AZFa+c	Азооспермия	Синдром «только клетки Сертоли»	Отсутствует	Неблагоприятный
AZFa+b+c	AZFa+b+c	Азооспермия	Синдром «только клетки Сертоли»	Отсутствует	Неблагоприятный

‘Частичные’ AZF-делеции						
частичные AZFa	делеции гена <i>DBY</i>	Азооспермия	Синдром «только клетки Сертоли»	Отсутствует	Неблагоприятный	
	Делеции и мутации гена <i>USP9Y</i>	Астенотератозооспермия или олигозооспермия нетяжелой степени	-	Возможно даже из эякулята	Благоприятный, описаны случаи сохранения фертильности у мужчин с мутациями гена <i>USP9Y</i>	
частичные AZFb	От делеции отдельных маркеров до протяженных делеций (2/3 региона AZFb)	Различные формы патозооспермии в зависимости от размера делеции от азооспермии, олигоспермии различной степени тяжести, астено-/терато-/зооспермии до нормозооспермии	Различная степень нарушения/сохранения сперматогенеза от азооспермии до нормозооспермии	В случае сохранения сперматогенеза возможно во многих случаях, а также у большинства из эякулята	Может быть благоприятный, в том числе с сохранением естественной фертильности (при мелких микроделециях, например в пределах палиндрома P3)	
частичные AZFc:	b2/b3 gr/gr b1/b3 и другие	Различные формы патозооспермии от азооспермии, олигоспермии различной степени тяжести, астено-/терато-/зооспермии до нормозооспермии	Различная степень нарушения/сохранения сперматогенеза от азооспермии до нормозооспермии	В случае сохранения сперматогенеза возможно во многих случаях, а также у большинства из эякулята	Часто благоприятный с сохранением естественной фертильности	

Приложение 16 (Табл. 10).

Результаты медико-генетического обследования пациентов с Y-позитивными аномалиями формирования пола и/или мутациями половых хромосом, обусловленных числовыми и/или структурными мутациями гоносом, а также их отцов.

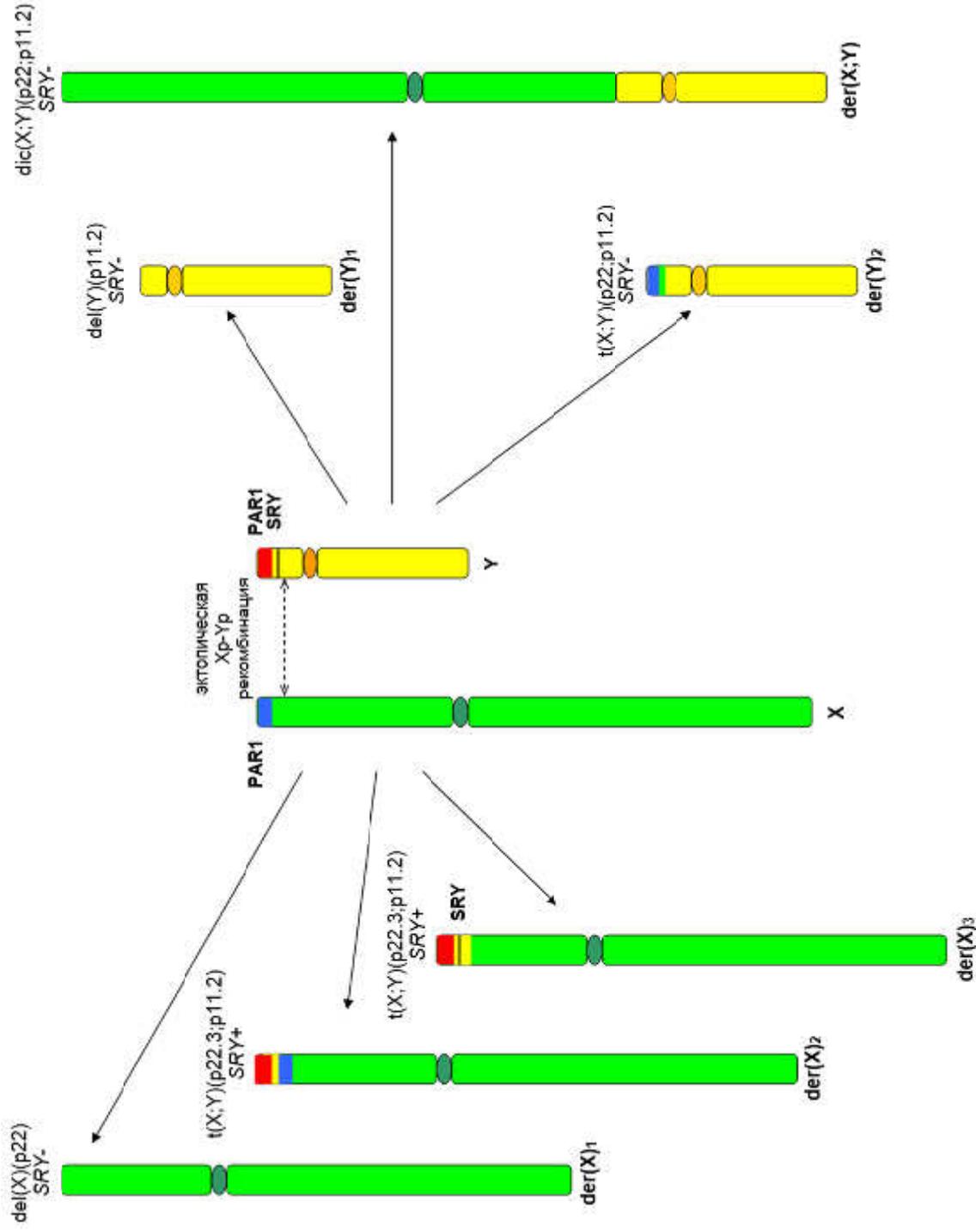
№	Код пациента	Возраст	Пол	Диагноз/ фенотип	Кариотип, результаты FISH анализа	Результаты ДНК-анализа	Кариотип отца, результаты ДНК-анализа	Фенотип отца
1	AZF1125	12 лет	М	НФП	mos 45,X(29%)/46,X,idel(Y)(q11.2)(59%)/46,X,del(Y)(q11.2)(6%)/47,X,idel(Y)(q11.2),del(Y)(q11.2)(3%)/47,X,idel(Y)(q11.2)idel(Y)(q11.2)(3%)	del AZFb+c	Микроделаций Y не обнаружено	Здоров
2	AZF1186	Н.д.	М	НФП, гипогнадизм, крипторхизм	46,X,del(Y)(q11.2)	del AZFb+c	46,XY; del b2/b3	Здоров
3		4 года	М	НФП, гипоспадия	45,X/46,XY	del AZFc (b2/b4)	46,XY; del AZFc (b2/b4)	Бесплодие I
4	AZF1306	1 год	М	тетрасомия Y	45,X/49,XYYY, 45,X (21,2%), 46,XY (1,2%), 47,XY (7%), 48,XY (14,1%), 49,XYYY (56,5%)	del b2/b3	46,XY; del b2/b3	Здоров
5	AZF1476	16 лет	М	НФП, тестикуллярный дисгенез	mos 45,X[16]/46,X,del(Y)(q12)[14], ish idel(Y)(q11.2)(DYZ3x2, SRYx2), nuc ish(DXZ1x1)[13]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[167]	del AZFb+c	Микроделаций Y не обнаружено	Здоров
6	AZF1762	8 лет	М	Вариант синдрома Клайнфельтера	48,XXYY	del b2/b3	del b2/b3	Здоров

№	Код пациента	Возраст	Пол	Диагноз/ фенотип	Кариотип, результаты FISH анализа	Результаты ДНК-анализа	Кариотип отца, результаты ДНК-анализа	Фенотип отца
7	AZF1936	3 мес.	М	НФП, тестискулярный дисгенез	mos45,X(47%)/46,XY(53%)	del b2/b3	del b2/b3	Здоров
8	П.А.	14 лет	М	НФП, Смешанная дисгенезия гонад, гипоспадия	mos 45,X(37%)/46,X, idic(Y)(p11)(45%)/47,XY+idic(Y)(p11)(6%)/46,XY(12%)	Микроделеций Y не обнаружено	Микроделеций Y не обнаружено	Здоров
9	SR Y237	12 лет	Ж	СПП	mos 45,X[8]/46,XY[47]	Последовательно сти Y-хромосомы обнаружены !	Микроделеций Y не обнаружено	Здоров
10	AZF4051	1 мес.	Ж	НФП	45,X/46,XY	del b2/b3	Микроделеций Y не обнаружено (не родной отец по данным ДНК-анализа!)	Здоров
11	Б.Д. (An16)	2 г.	М	НФП	mos 46,XX(34%)/46,XY(66%),	Химеризм. Микроделеций Y не обнаружено	46,XY, Микроделеций Y не обнаружено	Здоров

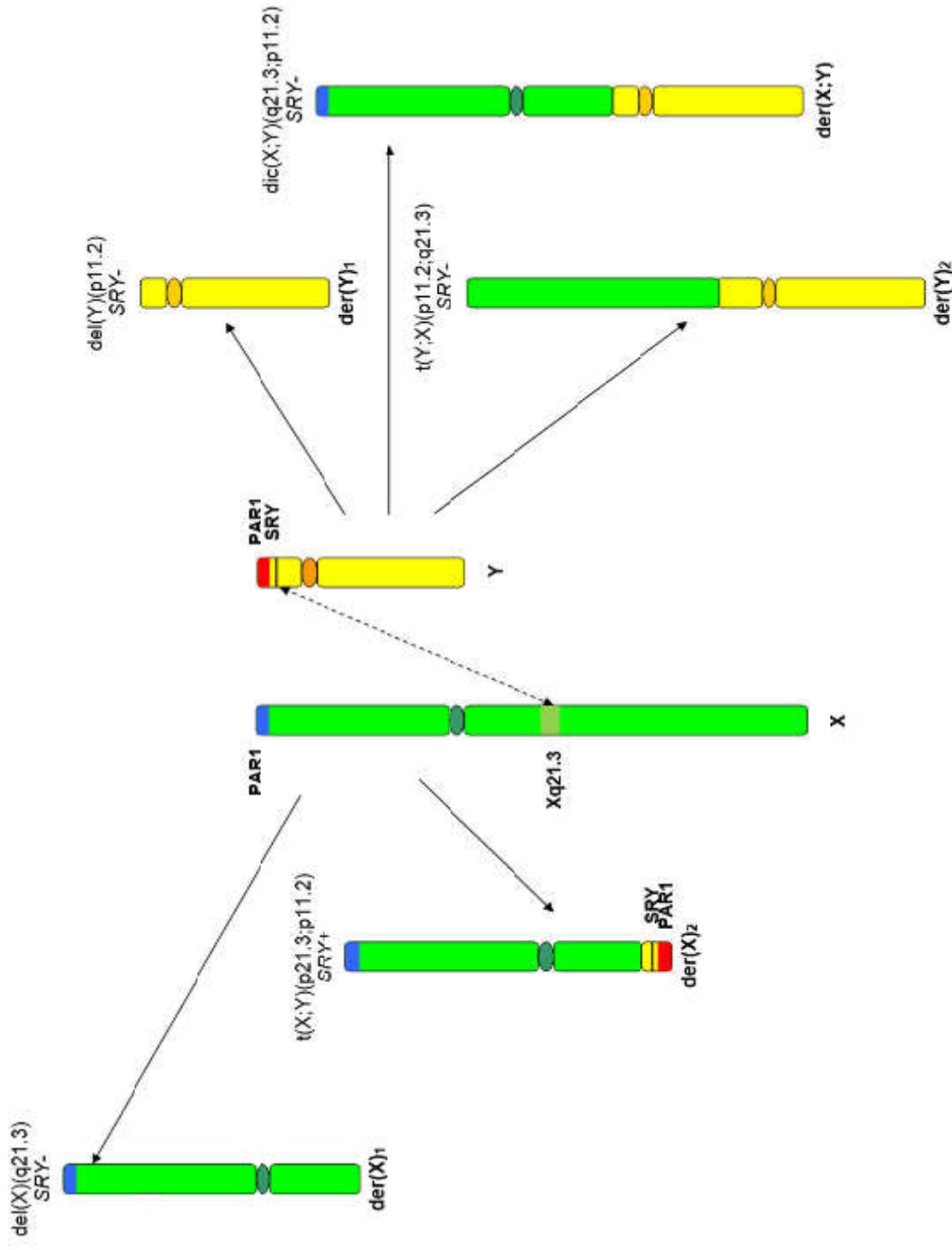
№	Код пациента	Возраст	Пол	Диагноз/ фенотип	Кариотип, результаты FISH анализа	Результаты ДНК-анализа	Кариотип отца, результаты ДНК-анализа	Фенотип отца
12	SR Y269	6 лет	Ж	Гоносомно обусловленное НФП	46,X,del(X)(q22), ish der(X)t(X;Y)(q21.3p11.3)(DXZ1+,SR Y+) nuc ish (DXZ1x2,SR Yx1)[200]	Скрытая Xq; Yp транслокация	46,XY. Микроделеции Y не исследовали	Здоров
13	Мах.	5 лет	М		48,XXXXY	Микроделеций Y не обнаружено	46,XY. Микроделеции Y не исследовали. Причина – сочетание нерасхождения X-хромосом у матери	Здоров (мать – здорова)
14	М.Д./ SR Y206	4 года	М	МВПР	45,X,t(Y;18)(p11.1;p11.1).ish psu dic(18;Y)t(Y;X;18)(q12;p?:p11.1) (WCP18+,D18Z1+,WCPY+,DYZ3+,WCP X+,SR Y+)dn	Скрытая Xq; Yp транслокация	46,XY. Микроделеции Y не исследовали	Здоров
15	Аг.	1 мес.	М	Трисомия 21	47,X,inv(Y)(p11.2q11.2),+21	del b2/b3	46,X,inv(Y) (p11.2q11.2); del b2/b3	Здоров
16	Тройня Г.	1 мес.	М	НФП?	mos 46,XX(7%)/46,XY(93%)	del gr/gr	46,XY;	Здоров
17			М	НФП?	mos 46,XX(4%)/46,XY(96%)	del gr/gr	del gr/gr	
18			Ж	НФП	mos 46,XX(93%)/46,XY(7%), химеризм	del gr/gr		



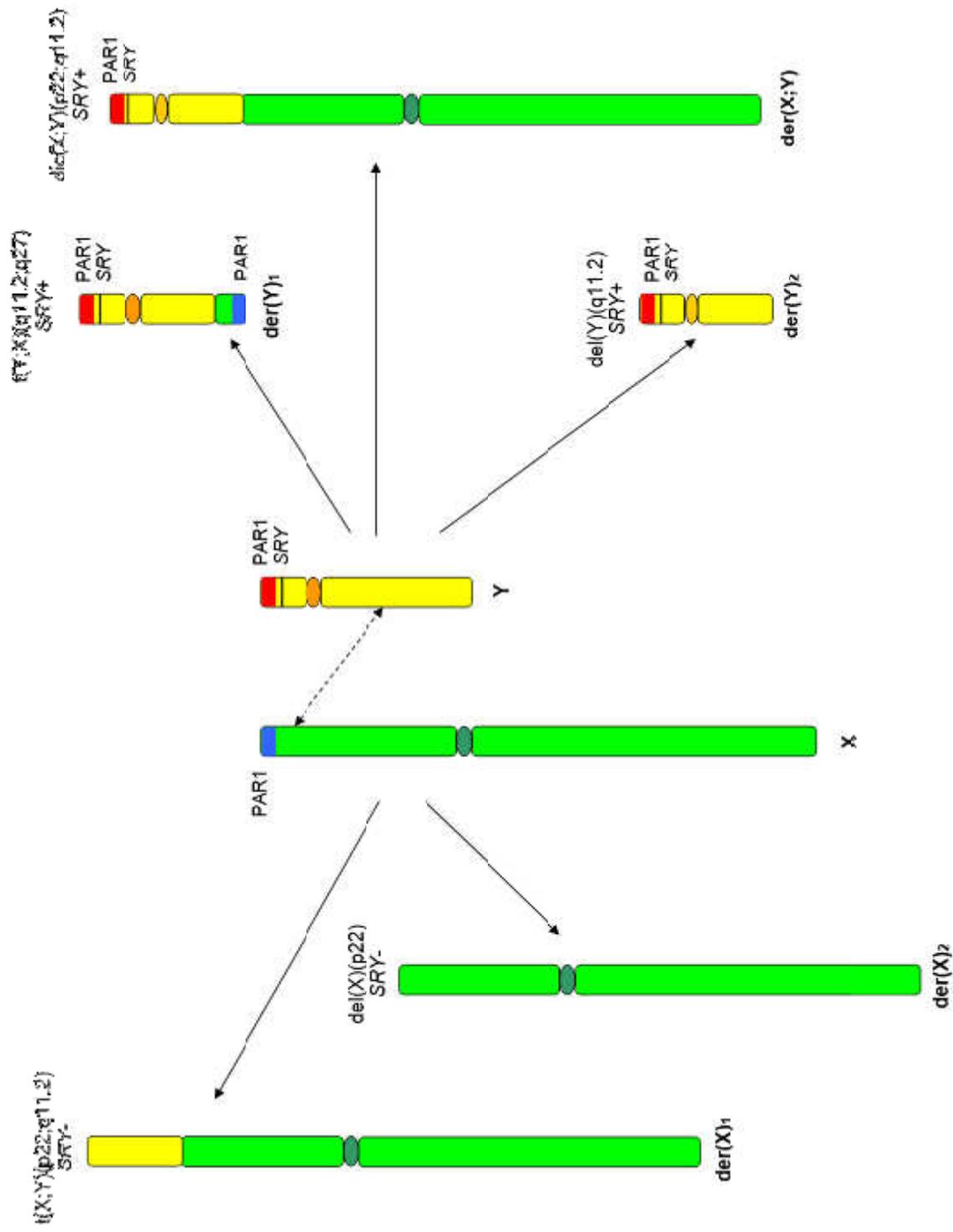
Приложение 17 (Рис. 7). Схематичное изображение типов X-Y нормальной рекомбинации (I-III) между псевдоаутосомными регионами хромосом X и Y человека (из Stow T.J. 2013, в собственной модификации): PAR1 – Xp22.3/Yp11.3, PAR2 – Xq28/Yq12; 'PAR3' (гипотетически) – Xq21.3/Yr11.2(XTR). Области конъюгации показаны перекрестом. Положение центромера на гоносомах указано; точное соотношение размеров хромосом X и Y не соблюдено.



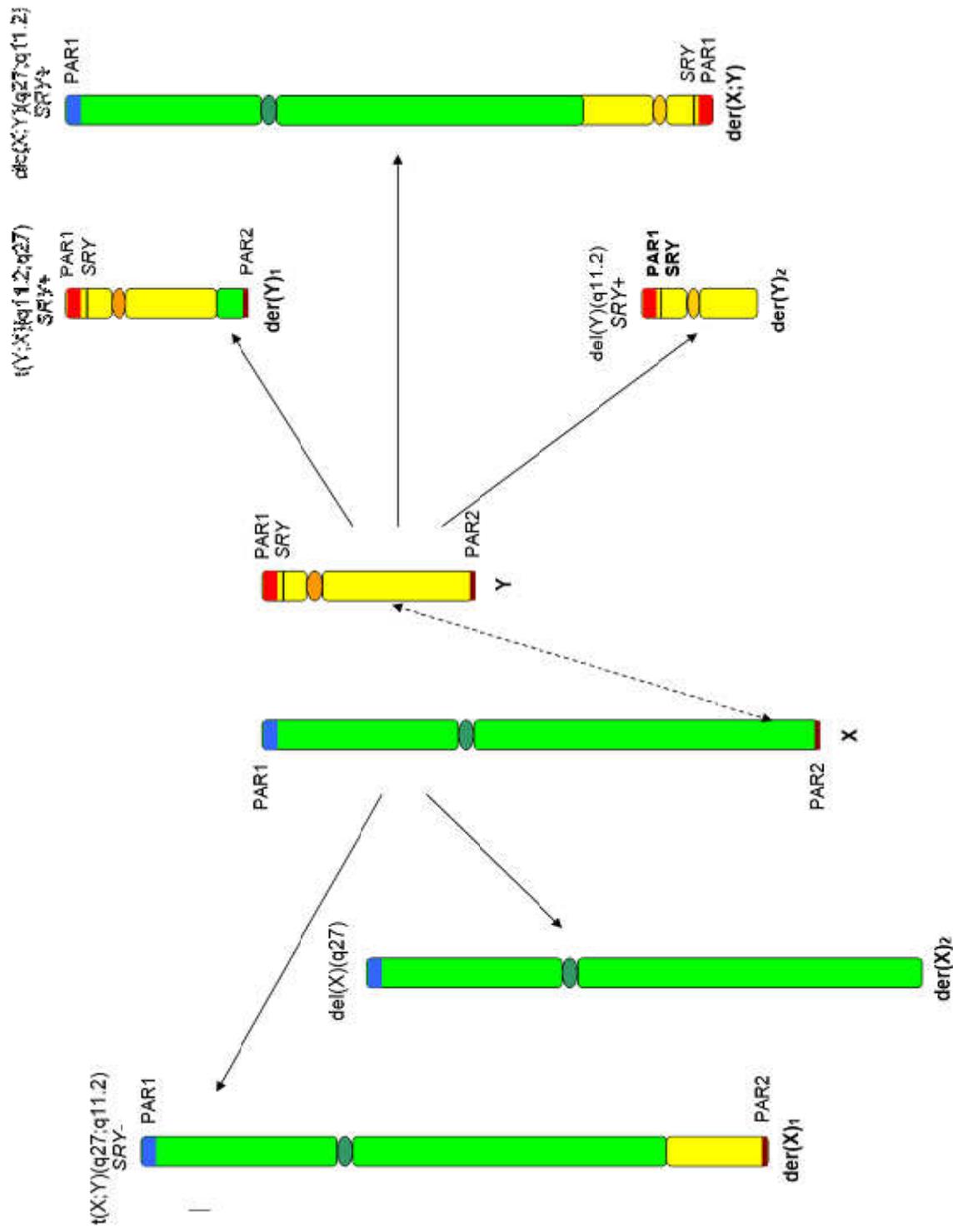
Приложение 18 (Рис. 8). Структурные перестройки гоносом – продукты (der) эктопической рекомбинации Xp-Yp проксимальнее регионов PAR1.



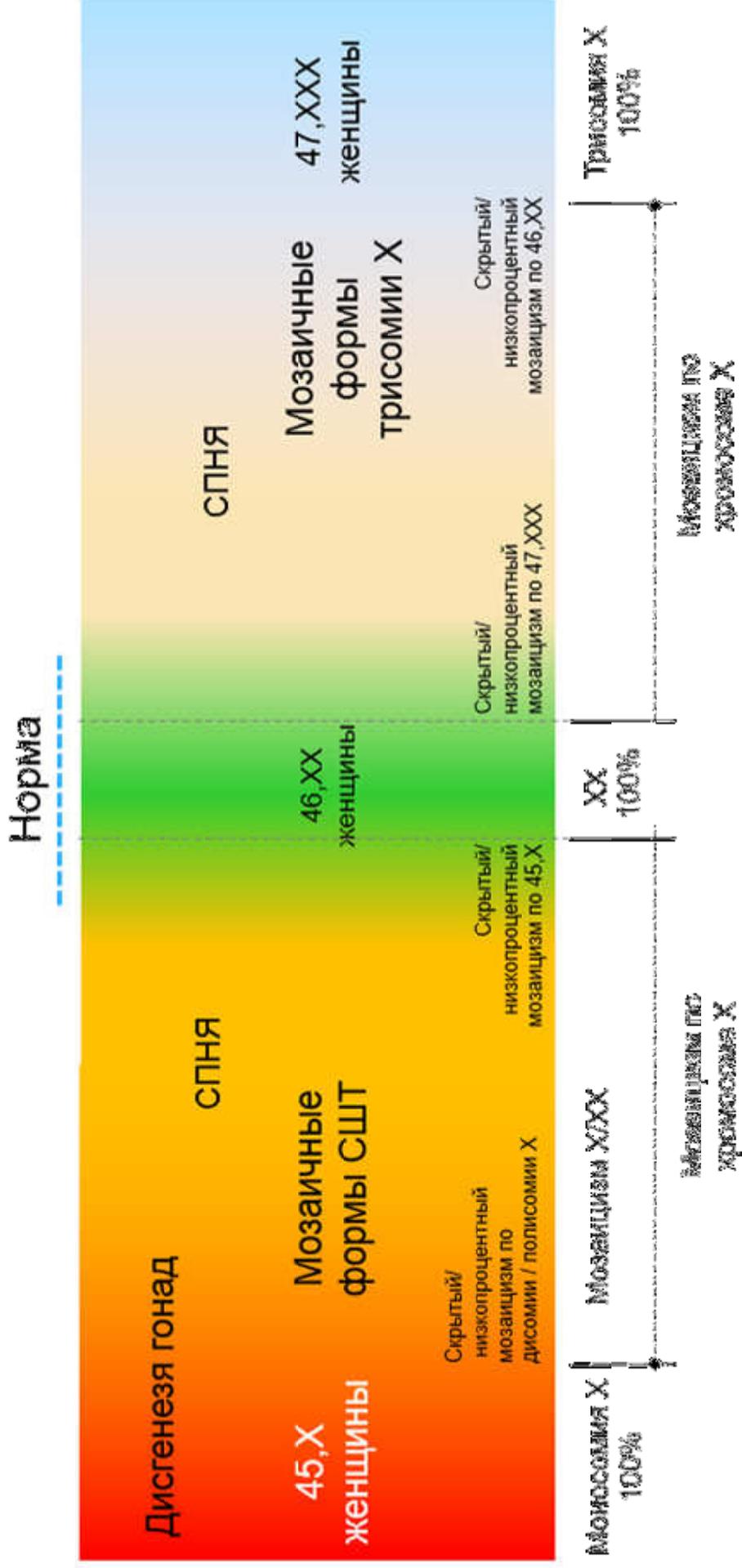
Приложение 19 (Рис. 9). Структурные перестройки гоносом – продукты (der) рекомбинации Xq- Yp между регионами XTR (Xq21.2/Yp11.2).



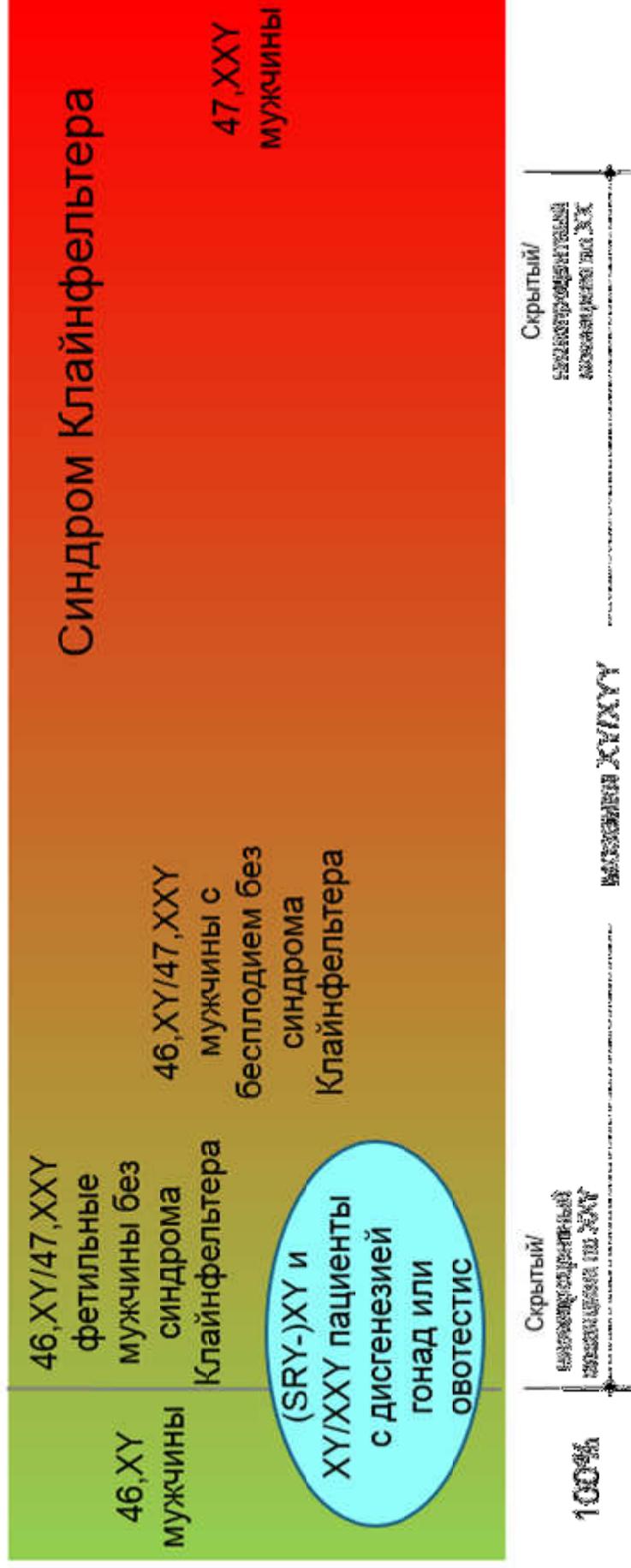
Приложение 20 (Рис. 10). Структурные перестройки гоносом – продукты (der) рекомбинации Xp-Yq между регионами (Xp22/Yq11.2).



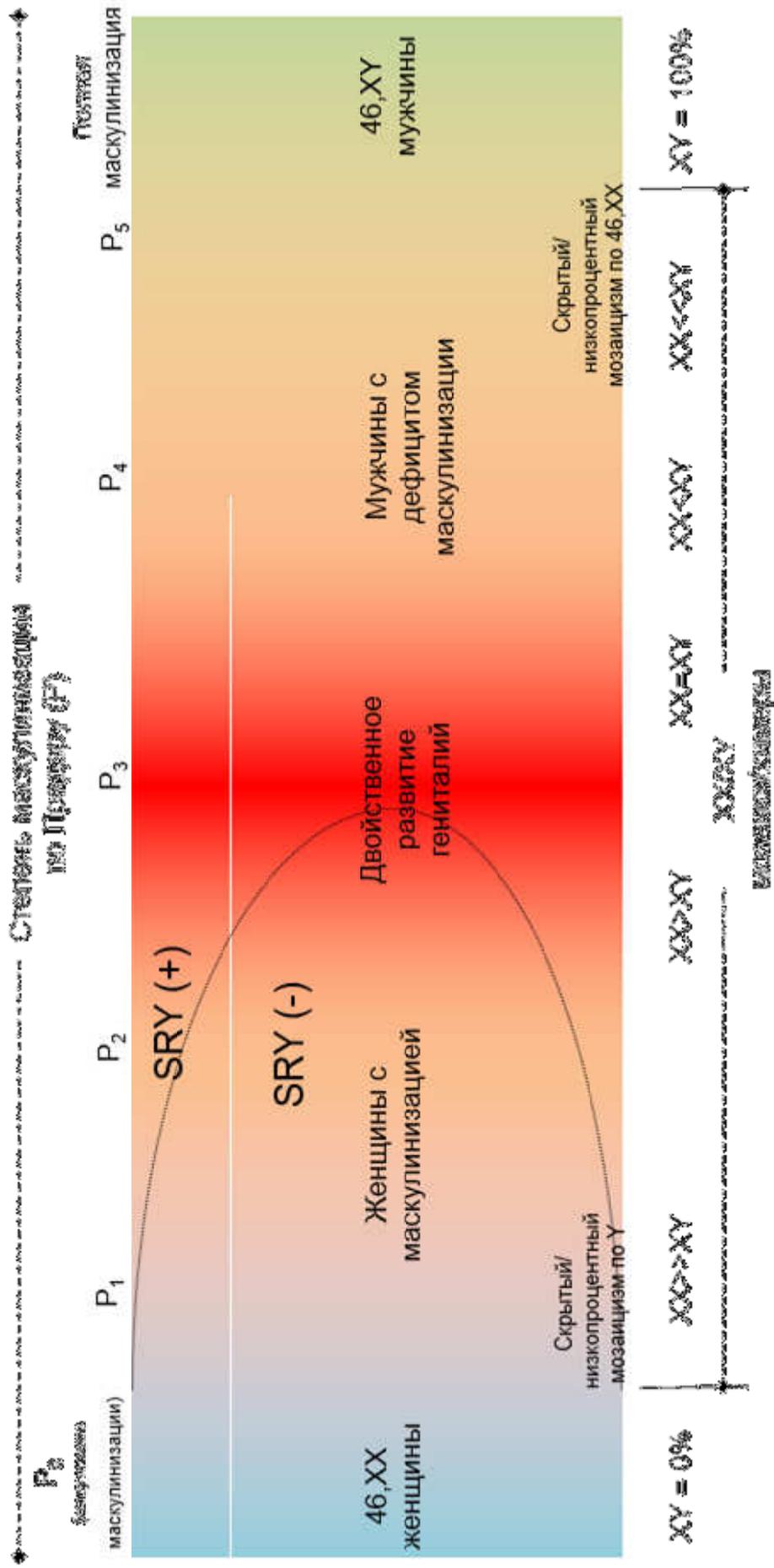
Приложение 21 (Рис. 11). Структурные перестройки гоносом – продукты (der) рекомбинации Xq- Yr между регионами (Xp27/Yq11.2).



Приложение 22 (Рис. 12). Континуум генитальных фенотипов при мозаицизме по хромосоме X (кроме тетра- и пентасомии X).



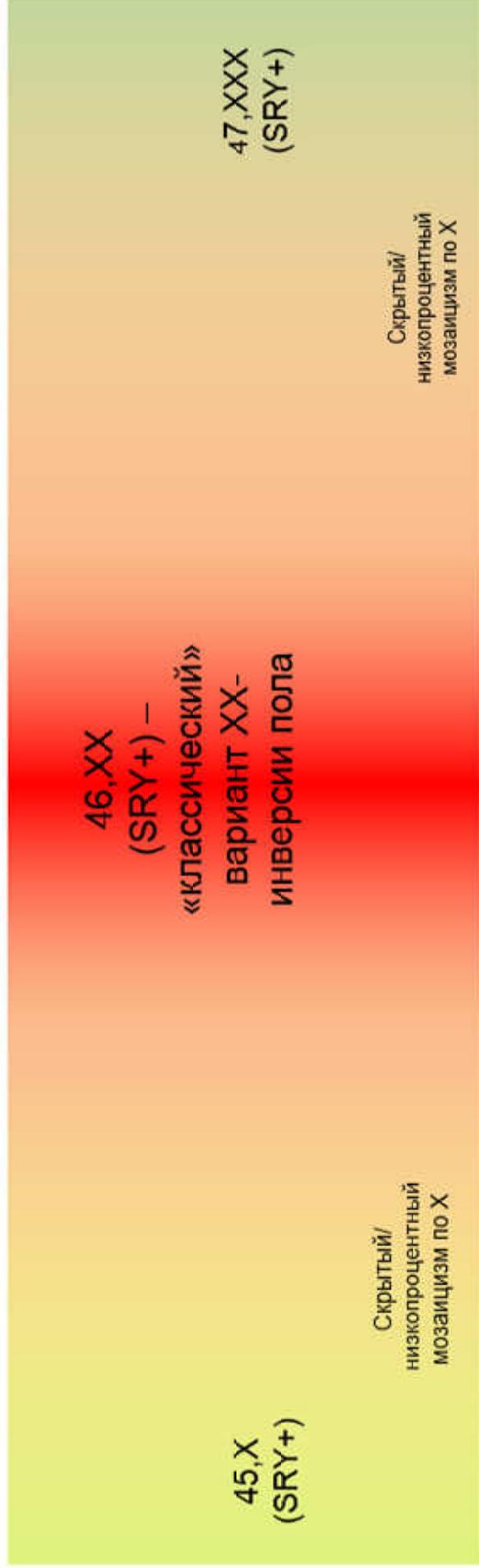
Приложение 23 (Рис. 13). Континуум генитальных фенотипов при дисомии по хромосоме X.



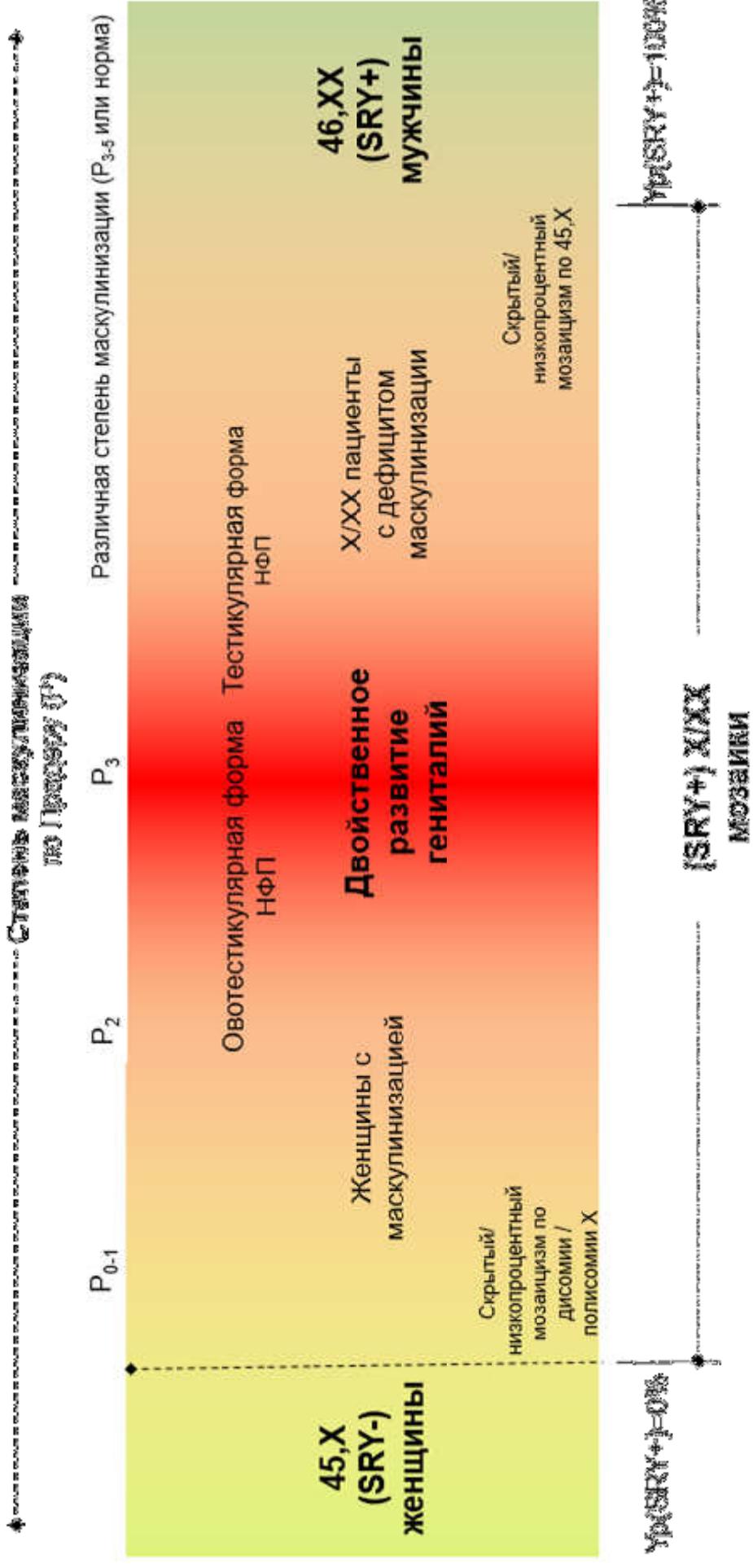
Приложение 25 (Рис. 15). Континуум генитальных фенотипов при кариотипе 46,XX/46,XY.

◆-----◆
 $Yr+(SRY+)$
~~XX-инверсия~~ ~~XX-инверсия~~

Тесткулярная форма (синдром 46,XX-мужчина) Овогестикакулярная форма Нейт



Приложение 26 (Рис. 16). Континуум генитальных фенотипов при $SRY+/Yr+$ XX -инверсии пола.



Приложение 27 (Рис. 17). Континуум генитальных фенотипов при $SRY+Yr+X/XX$ мозаицизме.

Мутации гоносом и их генетические эффекты и фенотипические последствия на репродуктивную систему у человека.

Уровни мутационных изменений гоносом	Генетические эффекты	Фенотипические последствия на репродуктивную систему
Хромосомные:		
- Численные мутации (анеуплоидии)	Изменение дозы X- и/или Y-сцепленных генов, нарушение мейоза	Синдромы, связанные с анеуплоидией гоносом (Клайнфельтера, Шерешевского-Тернера, дисомии Y, полисомии Y, трисомии X, полисомии X)
- Структурные перестройки	Нарушение мейоза, рекомбинации хромосом, мейотическая и митотическая нестабильность, особенно кольцевых, дицентрических хромосомах, изохромосом, терминальных делеций хромосомы Y	Различные синдромы, НПП, нарушение репродуктивной функции или отсутствия явных фенотипических проявлений в зависимости от локализации, типа структурной перестройки и процентной выраженности среди клеток
- Полиморфизмы (хромосомные гетероморфизмы)	Возможна склонность к хромосомной нестабильности, аномальной рекомбинации возникновению и микроструктурных перестроек	Во многих случаях – фенотипически нейтральны, в однако могут являться фактором риска нарушения репродукции
Химеризм XX/XY	Изменение дозы X- и Y-сцепленных генов, нарушение дифференцировки гонад, развития половой системы, гаметогенеза, мейоза	Различный спектр фенотипов от овотестикулярной формы НПП до дистенезии гонад, бесплодия
Гоносомный мозаицизм, в том числе низкоуровневый	Зависят от типа и %-ной выраженности мутантного(ных) клона(ов). При низкопроцентном мозаицизме возможно отсутствие эффекта	Различный спектр фенотипов от различных форм НПП, синдромов гоносомной анеуплоидии, до нарушения репродуктивной системы даже сохранения репродуктивной функции (при низкопроцентом) мозаицизме

Уровни мутационных изменений геномом	Генетические эффекты	Фенотипические последствия на репродуктивную систему
Микроструктурные перестройки:		
- Не являющиеся полиморфизмами	Как правило, мутации <i>de novo</i> .	Различные фенотипы, синдромы протяженной. делеции (при делециях хромосомы X
- Полиморфизмы (микроструктурные полиморфизмы)	Как правило, наследуются. Возможная генетическая нестабильность перестроенной хромосомы	Могут быть как нейтральными, так и являться факторами риска нарушения репродукции
Генные мутации и ДНК-полиморфизмы		
- генные X- и Y-сцепленные мутации	Влияние на экспрессию других генов, вовлеченных в соответствующую генную сеть	Различные фенотипы, в зависимости от мутации, в случае X-сцепленных рецессивных мутаций – носительство
- ДНК полиморфизмы хромосом X и Y	Чаще являются нейтральными факторами. В случаях увеличения числа (экспансии) триплекотидных повторов приводят от премутации к полной мутации	Могут быть как нейтральными (чаще), так и являться факторами риска нарушения репродукции (реже)
Эпигенетические нарушения:		
- Аномалии инактивации X-хромосомы	Влияние на экспрессию X-сцепленных генов и экспрессивность (проявление и выраженность) X-сцепленных мутаций	Повышенная частота встречаемости аномальной X-инактивации при X-сцепленных мутациях и макро- и микроструктурных перестройках X
- Однородительские дисомии (ОРД)	Проявление X-сцепленных мутаций при изодисомии X	При изодисомии X и наличии X-сцепленных мутаций, нарушающих репродукцию
- Эпигенетические нарушения отдельных генов X и Y	Нарушения функции генов, подверженных X- и Y-инактивации	Не известны. Нарушение формирования пола, репродуктивной функции?

Возможности различных генетических методов в диагностике мутаций половых хромосом.

Кариотип/тип аномалии или мутации половых хромосом		Вид исследования, возможность установления кариотипа и детекции соответствующих мутаций									
		Стандартное цитогенетическое	FISH	CGH- (array)	CNV	ЩЦР	КФ-ЩЦР	MLPA	Секвенирование ДНК		
Хромосомный мозаицизм	да	нет	нет	нет	нет	нет	Частично (анеусомии, пloidность)	нет			
	да		да ($\geq 20\%$)		Да (при мозаицизме по Y, при изучении маркеров с высокой гетерозиготностью по X)	Да ($\geq 5-30\%$ в зависимости от типа мозаицизма)	Да (при SNP и точковых мутациях)				
	нет	да	нет	да	Да (при мозаицизме по Y, при изучении маркеров с высокой гетерозиготностью по X)	Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	Не используется				
	Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	да	да ($\geq 20\%$)		Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	Да (при SNP и точковых мутациях)				
Химеризм	Да (но не позволяет отличить от мозаицизма XX/XU)			да	да	да	да	да			
	нет			Да							
Хромосомный мозаицизм	да		да ($\geq 20\%$)		Да (при мозаицизме по Y, при изучении маркеров с высокой гетерозиготностью - по X)	Да ($\geq 5-30\%$ в зависимости от типа мозаицизма)	Да (при SNP и точковых мутациях)				
	нет	да	нет	да	Да (при мозаицизме по Y, при изучении маркеров с высокой гетерозиготностью - по X)	Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	Не используется				
	Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	да	да ($\geq 20\%$)		Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	Не всегда (в зависимости от типа мозаицизма)	Да (при SNP и точковых мутациях)				

Кариотип/тип аномалии или мутации половых хромосом		Вид исследования, возможность установления кариотипа и детекции соответствующих мутаций							
		Стандартное цитогенетическое	FISH	CGH- (array)	CNV	ПЦР	КФ- ПЦР	MLPA	Секвенирование ДНК
Структурные перестройки хромосом X и Y	Цитогенетический идентифицируемые	да	нет	нет	нет	нет	нет/ да*	нет	нет
		да	да	да	да	да (не все)	да	да	Нет (только для картирования точек разрыва)
	нет (только предполагать)	да			да (не всегда)				Не используется
	нет	да (транслокации)	нет	нет	Нет (редко – да, если точки разрыва фланкированы праймерами микроинвесии)	нет	да*	Нет	
Микроструктурные	нет	Да (транслокации, инверсии)			Да (микроделеции Y)			Используют для картирования точек разрыва в сочетании с другими методами	
	нет	нет							

Кариотип/тип аномалии или мутации половых хромосом		Вид исследования, возможность установления кариотипа и детекции соответствующих мутаций							
		Стандартное цитогенетическое	FISH	CGH- (array)	CNV	ПЦР	КФ- ПЦР	MLPA	Секвенирование ДНК
Генные мутации	Да	нет	нет	нет	нет	нет	Частично (анеусомии, плоидность)	нет	нет
Генные мутации	нет	нет	да *	да *	да (делеции), нет (дупликация)	нет	да	Да	да
							нет/ да*	да * (в сочетании с другими методами, например, с рестрикцией)	нет
Эпигенетические аномалии	Иногда **	нет	нет	нет	нет	да * (в сочетании с другими методами, например рестрикцией)	Нет	используется	нет

Примечание: * - в случаях расположения исследуемых маркеров(локусов) в область гена/расположения мутации.

** - в случае структурной перестройки хромосомы X возможна косвенная оценка характера X-инактивации (случайный или выборочный) при сравнении времени репликации перестроенной и нормальной хромосомы X.

Генотипы по наличию/отсутствию локусов *SRY*, *AMELY*, *AZF* Y-хромосомы и соответствующие им наиболее частые фенотипы, кариотипы и аномалии половых хромосом.

Генотипы (по наличию/отсутствию соответствующих локусов Y-хромосомы)	Фенотипы		Кариотипы		Возможные перестройки с вовлечением Y-хромосомы или ее материала
	Норма	Патология репродуктивной системы	Норма	Кариотипы при аномалиях половых хромосом	
<i>SRY</i> + <i>AMELY</i> + <i>AZF</i> +	Нормальный мужской	Различные синдромальные гоносомно-обусловленные (СШТ, Клайнфельтера и другие (Y+) синдромы) и 46,XY НФП. Мужчины с нарушением репродуктивной функции без НФП	46,XY	Дисомия или полисомия Y (47,XY ⁺ ; 48,XY ⁺⁺ и др.), синдром Клайнфельтера и его варианты. Различные структурные перестройки Y и типы мозаицизма 45,X/46,XY по нормальной или перестроенной Y-хромосоме с наличием соответствующих локусов	Различные структурные перестройки Y: сбалансированные (инверсии Y) и несбалансированные (терминальные делеции короткого плеча Yp11.3 дистальнее <i>SRY</i> и длинного плеча delYq11.23 дистальнее <i>AZF</i> c, delYq12), изоцентрические и кольцевые хромосомы с точками разрыва дистальнее локусов <i>SRY</i> и <i>AZF</i> c
<i>SRY</i> + <i>AMELY</i> + <i>AZF</i> -	-	Различные синдромальные и несиндромальные нарушения репродукции. Фенотипы: от мужского с бесплодием, различной степени маскулинизации до женского (гоносомно-обусловленные НФП)	-	46,XY (при <i>AZF</i> /Yq11.2 микроделециях) Немозаичные: 46,X,del(Y)(q11.2) 46,X,r(Y) 46,X,idi(Y)(q11.2) или мозаичные: с различными клонами по количеству перестроенных хромосом и с клоном 45,X. 46,X,der(X;Y)(p22.3;q11.2) и др.	Различные структурные перестройки Y с потерей части или всего Yq. Различные типы мозаицизма по нормальной (при микроделеции <i>AZF</i>) или перестроенной хромосоме Y: r(Y), idi(Y), del(Yq11.2). Некоторые типы X-Y и Y-аутосомных транслокаций

Генотипы (по наличию/отсутствию соответствующих локусов Y-хромосомы)	Фенотипы		Кариотипы		Возможные перестройки с вовлечением Y-хромосомы или ее материала
	Норма	Патология репродуктивной системы	Норма	Кариотипы при аномалиях половых хромосом	
<i>SRY</i> + <i>AMELY</i> - <i>AZF</i> -	-	XX-инверсия пола (синдром 46,XX- мужчина или 46,XX- тестикулярная форма НФП). Маскулинизация от полной до неполной	-	45,X 45,X/46,XX 45,X/46,XX/47,XXX 46,XX 47,XXX	Yr:Xr транслокации (наиболее часто встречающийся тип перестройки), реже обнаруживают Yr; аутосомные транслокации и Yr:Xq транслокации (описаны единичные случаи)
<i>SRY</i> + <i>AMELY</i> - <i>AZF</i> +	Нормальный мужской	Не описана	46,XY	Не сообщали	Редкий полиморфизм (?) при кариотипе 46,XY
<i>SRY</i> - <i>AMELY</i> + <i>AZF</i> +	-	Дисгенезия гонад XY (10-15%), СПТ и овотестикулярная форма НФП (редко)	-	46,XY (при микроструктурных хромосомных перестройках с вовлечением локуса <i>SRY</i> 46,X,del(Y)(p11) 46,X,idel(Y)(p11) 46,X,r(Y) или мозаичные: с различными клонами по количеству перестроенных хромосом и с клоном 45,X	Различные перестройки Y: терминальные делеции короткого плеча (Yp11), кольцевые хромосомы Y и изодисцентрические хромосомы Yq с потерей дистальной части Yp11 с локусом <i>SRY</i> , Yp11.3 микроделеции, X-Y транслокации (<i>SRY</i> - дериват Y)

Генотипы (по наличию/ отсутствию соответствующих локусов Y- хромосомы)	Фенотипы		Кариотипы		Возможные перестройки с вовлечением Y-хромосомы или ее материала
	Норма	Патология репродуктивной системы	Норма	Кариотипы при аномалиях половых хромосом	
<i>SRY-AMELY+AZF-</i>	Не сообщали (вероятно, нормальный женский кариотип, фенотип не описан)				Возможно при транслокации материала Yp11.2 с локусом <i>AMELY</i> на аутосоме или X-хромосоме, при сохранении Ycen – маркерная хромосома – дериват Y, содержащая Ycen и перичентромерный хроматин
<i>SRY-AMELY-AZF+</i>	-	Женщины с XX-дисгенезией гонад, СПНЯ, бесплодием	-	46,X,der(X),t(X;Y)(p22.3;q11.2) 46,X,der(X),t(X;Y)(q22;q11.2) Изохромосома Yr,изодипентрические хромосомы Yr с точками разрыва в локусе Yr11 между локусом <i>AMELY</i> и центромерой Y Изодипентрические (регулярные или мозичные)	Транслокации длинного плеча с эухроматином Yq11.2 на X-хромосоме (Yq;Xr и Yq;Xq транслокации), или аутосоме
<i>SRY-AMELY-AZF-</i>	Нормаль- ный женский	Различные фенотипы: несиндромальные и синдромальные Y(-) гоносомно-обусловленные и 46,XX НФП (СПТ, SRY- 46,XX-мужчины и др.). Женщины с нарушением репродуктивной функции	46,XX	Различные количественные или структурные аномалии хромосомы X (45,X; 45,X/46,XX; 47,XXX), 46,X,i(Xq); 45,X/46,X,t(X) и др.), X-X и X-аутосомные транслокации	Транслокации гетерохоматина плеча (Yq12) на Xили аутосоме. Возможно наличие маркерной хромосомы (mat) маленького размера (дериват Y) при, содержащей центромеру (Ycen) и перичентромерный хроматин; инсерции материала Y-хромосомы, содержащие другие локусы Y

Благодарность

Выражаю глубокую признательность своему научному консультанту и Учителю – руководителю лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», д.б.н., профессору Любови Федоровне Курило, руководителю лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», д.б.н., профессору Александру Владимировичу Полякову за любезно предоставленную коллекцию ДНК и проведение молекулярно-генетических исследований, а также за ценные предложения и замечания, а также своим коллегам – сотрудникам лабораторий: генетики нарушений репродукции, ДНК-диагностики, эпигенетики, пренатальной диагностики, общей цитогенетики, группы клинической цитогенетики, врачам-генетикам поликлинического отделения ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», а также цитогенетикам, врачам-генетикам, эндокринологам, андрологам и гинекологам других лечебных и диагностических медицинских учреждений РФ за непосредственное участие, помощь, предоставление биологического материала и сведений о пациентах, консультирование в ходе выполнения исследования. Без их содействия настоящая работа не была бы выполнена.