

УДК 575

Муравйова О. О., асп.

Одеський медичний університет, Інститут нових медичних технологій та проблемних захворювань, Валіховський провул. 2, Одеса, 65026, Україна
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ХРОМОСОМ У ПАЦІЄНТІВ З ПОРУШЕННЯМ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ

Проведено дослідження Y-хромосоми у пацієнтів з порушенням репродукції. Відзначена роль структурних змін Y-хромосом у виникненні порушень сперматогенезу, що може підвищувати ризик спонтанних абортів у жінок. Спостерігається залежність між структурою гетерохроматинових ділянок хромосом і безпліддям у чоловіків.

Ключові слова: Y-хромосома, гетерохроматин, безплідність.

Чоловіче безпліддя дуже часто супроводжується хромосомними аномаліями. Спостерігається кореляція між порушеннями сперматогенезу у чоловіків і спонтанними абортами у жінок [1, 2]. У чоловіків з безпліддям аномалії статевих хромосом складають 75 %, аутосом — 25%. Відомо, що безплідністю страждають приблизно 15 % подружніх пар, і в 40-50 % цих випадків чоловіки мають кількісні та якісні порушення сперматогенезу. Довжина Y-хромосоми складає 2-3% гаплоїдного геному людини. Раніше вважали, що поліморфізм Y-хромосоми не впливає на чоловічу безплідність, проте сьогодні ця точка зору переглядається. За допомогою цитогенетичного дослідження визначено три поліморфні ділянки Y-хромосоми, які, як вважають, мають відношення до репродуктивної функції чоловіків:

1. Псевдоаутосомні ділянки (PAR), розташовані на кінцях як короткого (PAR1), так і довгого (PAR2) плеча хромосоми;
2. Еухроматинова ділянка, розташована дистально від PAR1;
3. Гетерохроматинова ділянка, яка включає дистальний фрагмент Yq. Останній є поліморфним по довжині у різних чоловіків.

В Y-хромосомі людини розташовані гени, контролюючі диференціювання статі, формування яєчок і процес сперматогенезу (AZFa, AZFb, AZFd, AZFc, DAZ, SRY та інш.) [3, 4, 5].

Порушення сперматогенезу (олігозооспермія, астенозооспермія, азооспермія, піоспермія) є найбільш розповсюдженими симптомами при різних формах чоловічого безпліддя [6, 7].

Відомо, що більшу частину Y-хромосоми складає гетерохроматин. Гетерохроматинні ділянки хромосом найчастіше приймають участь у хромосомних перебудовах при різних формах безпліддя [6, 8, 9].

Метою даного дослідження є вияв аномалій Y-хромосоми у пацієнтів з порушенням репродуктивної функції.

Матеріали та методи

Цитогенетичні дослідження провадили у чоловіків з порушеннями сперматогенезу, виявленими за їх обстеження перед процедурою штучного запліднення. Матеріалом для дослідження були лімфоцити венозної крові; стерильний забір крові і культивування клітин здійснювали у відповідності із стандартною методикою каріотипування (напівмікрометод) [10]. Клітини крові культивували 72 години при температурі 37 °С на середовищі 199 (5 мл) з доданням фітогемаглютиніну (70-100 мкл на 1 флакон). Для кожного пацієнта використовувували по два флакони. На 69 годині культивування додавали колхіцин у концентрації 0,2 мкг/мл на 1,5 години, по закінченні інкубації з колхіцином культуру крові центрифугували 5-7 хвилин при 1500 об/хв, вилучали надосадкову рідину, ретельно подрібнювали і промивали клітинний осад, після чого заливали першою порцією фіксатора (7-8 мл, оцтова кислота: етиловий алкоголь 3 : 1). Фіксацію проводили в три етапи: 20 хв, 90 хв і 20 хв при температурі 18 °С. Препарати метафазних хромосом готували шляхом розкапування суспензії клітин після останньої фіксації з висоти 20-25 см на підготовлені мокрі охолоджені скельця. Після висушування на повітрі препарати забарвлювали по Гімза. Барвник готували на стандартному Na-K фосфатному буфері (рН 6,8), термін фарбування складав 5 хвилин. Перегляд препаратів здійснювали за допомогою мікроскопу Axiovert (Zeiss), окуляр 10, об'єктив 30 і 100. Для хромосомного аналізу відбирали клітини на стадії метафази з повним хромосомним набором, без хромосомних накладок. Було переглянуто 20 метафазних пластинок для кожного пацієнта. Підрахунок асоціацій акроцентричних хромосом провадили у відповідності з методикою А. К. Фролова [11]. Для кожної клітини визначали відношення довжини Y-хромосоми до середньої довжини хромосом 19 та 20 [9].

Результати дослідження та їх аналіз

Нами були обстежені пацієнти з порушеннями репродуктивної функції, які супроводжувались аномаліями сперматогенезу. У 57 % випадків виявлені кількісні та якісні порушення Y-хромосом (табл. 1).

Були виявлені істотні хромосомні аномалії. Один із пацієнтів (б) мав мозаїчний варіант синдрому Клайнфельтера. Як зазначає А. А. Прокоф'єва-Бельговська [8], ектопічне спаровування гетерохроматинних ділянок лежить в основі нерозходження статевих хромосом як у системі XX, так і в системі XY; зайва статева хромосома в свою чергу стимулює нерозходження хромосом у мейозі подібно екстремальним блокам гетерохроматину. У нашого пацієнта ця ситуація цілком вірогідна, оскільки він був мозаїком з таким каріотипом: 46, XY/45, XO/47, XXY/48, XXXY/48, XXYY. У іншого пацієнта (г) були виявлені клони клітин з маркерною акроцентричною хромосомою і дицентриком. У всіх пацієнтів знайдено екстремальні варіанти гетерохроматину і підвищену кількість асоціацій акроцентричних хромосом.

Каріотиби і аномалії хромосом у чоловіків з ознакою безпліддя

Пацієнти	Клінічний діагноз	Каріотип
а	Олігозооспермія	46,XY; Yq+
б	Олігозооспермія	Мозаїка клітин: 46,XY/ 47,XXY/ 48,XXXY/ 48,XXYY/45,XO;15ps+; 22ps++; Yq+
в	Азооспермія	46,XY/47,XY+mar/45,XY; dic (10;12);13p+s;15p++s-; 22ps+; Yq+
г	Астенозооспермія	46, XY; 14p+s; 21ps+; Yq++
д	Астенозооспермія Олігозооспермія	46, XY; 1qh+; Yq++
е	Азооспермія	46, XY; 13p-s; 14p+s+; 22ps+; Yq+
є	Нормоспермія, Олігозооспермія, Астенозооспермія, Піоспермія	46, XY; Dps-; 22ps-; Yq+
ж	Астенозооспермія	46, XY; 13ps+; 22ps+; Yq+
з	Олігозооспермія	46, XY/45, XY/46, XY,22,+mar; Yq-
и	Олігозооспермія, Астенозооспермія	46, XY; 14ps+; 21ps+; Yq+

У більшості досліджуваних осіб виявлено збільшення довгого плеча Y-хромосоми (крім пацієнта (з), у якого спостерігалось зменшення довжини цього плеча). Існує припущення, що короткі Y-хромосоми з малим гетерохроматиновим блоком можуть утворюватися за делецій частини гетерохроматинового матеріалу [9].

На підставі проведених досліджень можна припустити, що однією із причин виникнення порушень репродуктивної сфери у чоловіків є порушення сперматогенезу, пов'язані з незворотними змінами структури Y-хромосом. З цим узгоджуються дані про наявність принаймні трьох локусів у Yq11, контролюючих сперматогенез, до того ж кожний з цих локусів відповідає за різні стадії цього процесу [4, 5].

Особливої уваги заслуговує положення еухроматину та гетерохроматину в Y-хромосомі. Генетичні фактори, відповідальні за сперматогенез, розташовані поряд з еухроматином та гетерохроматином у довгому плечі Y-хромосоми. Гени AZFc і DAZ локалізуються поруч з гетерохроматиною ділянкою. Можна припустити, що безпліддя супроводжується гетерохроматинізацією еухроматинових ділянок хромосом. З цих позицій стає зрозумілим часте виникнення спонтанних абортів у пацієток, чоловіки яких мали подовжене довге плече Y-хромосоми.

У пацієнтів (г) і (д) якраз і спостерігалось подовжене довге плече (Yq⁺⁺). З'ясувалося, що збільшення довжини Y-хромосоми у цих осіб пов'язано не тільки із збільшенням ділянки гетерохроматину, але й з додатковими ділянками еухроматину. Збільшення розмірів Y-хромосом у пацієнтів (г) і (д) відбувається на фоні поліморфізму гетерохроматинових ділянок інших хромосом (1, 2, 9 та 16). Ці хромосомні перебудови потребують більш детального дослідження з використанням різних методів фарбування.

Результати проведених досліджень приводять до наступних висновків:

1. Існує кореляція між морфологічним поліморфізмом і якісним складом Y-хромосом у чоловіків і безплідністю подружніх пар.

2. Додатковий матеріал у гетерохроматинних ділянках хромосом може призводити до порушення сперматогенезу.

3. Поліморфізм структури гетерохроматинових ділянок хромосом у пацієнтів з порушеннями репродуктивної функції може бути діагностичним і прогностичним показником за таких захворювань, тому подальше вивчення цього поліморфізму є безперечно важливим.

Література

1. Egozcue S. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion // Human Reproduction Update. — 2000. — V. 6, № 1. — P. 93-105.
2. Подугольникова О. А. Нерасхождение хромосом человека. Гипотезы и факты // Генетика. — 1988. — Т. 25, № 3. — С. 389.
3. Крумина А. Р. Количественный анализ С-сегментов хромосом 1, 16 и Y у супружеских пар с нарушениями репродуктивной функции // Генетика. — 1987. — Т. 23, № 3. — С. 544-547.
4. Kucheria K. The present status of our understanding of human sex determination // Cytogenet Cell Genet. — 1997. — № 77. — P. 113.
5. Гоголевская Н. Д. Y-хромосома и мужское бесплодие // Проблемы репродукции. — 1999. — № 5. — С. 26-34.
6. Головачев Г. Д. Наследственность человека и внутриутробная гибель. — М.: Медицина, 1983. — С. 4-76.
7. Пособие по андрологии / Под ред. О. Л. Тиктинского. — Л.: Медицина, 1990. — С. 312-317.
8. Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. — М.: Наука, 1986. — С. 360-365.
9. Назаренко С. А. Внутрииндивидуальный полиморфизм Y-хромосомы человека как следствие делеции гетерохроматинового блока // Генетика. — 1987. — Т. 23, № 5. — С. 918-921.
10. Захаров А. Ф. Хромосомы человека. Атлас. — М.: Медицина, 1982 — С. 10-13.
11. Фролов А. К. Иммуноцитогенетика. — М.: Медицина, 1993. — С. 67.

Муравьева Е. А.

Одесский государственный медицинский университет, Институт новых медицинских технологий и проблемных заболеваний, Валиховский переулок, 2, Одесса, 65026, Украина

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХРОМОСОМ У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

Резюме

Проведены исследования Y-хромосом у пациентов с нарушениями репродуктивной сферы. Отмечается роль структурных изменений Y-хромосом в возникновении нарушений сперматогенеза, что может повышать риск спонтанных аборт у женщин. Наблюдается зависимость между структурой гетерохроматических участков хромосом и бесплодием у мужчин.

Ключевые слова: Y-хромосома, гетерохроматин, бесплодие.

Muravyova E. A.

Odessa Medical University, Institute of new medical technology and problem diseases, Valechovskiy per., Odessa, 65026, Ukraine

Odessa National University after I. I. Mechnikov, Department of Genetic and Molecylar Biology, Dvoryanskay st., 2, Odessa, 65026, Ukraine

CYTOGENETIC INVESTIGATIONS OF CHROMOSOMES OF PATIENTS WITH ABNORMALITES IN REPRODUCTION FUNCTION

Summary

We have conducted investigation of Y-chromosome of patients with abnormalites in reproduction function. It is noted the role of Y-chromosome in the rise abnormalities of spermatogenesis. That gives the risk for the rise of spontaneous abortions. There is dependence between structure of heterochromatic regions chromosomes and problems of male infertility.

Key words: Y-chromosome, heterochromatin, infertility.