

Геномные технологии в диагностике нарушений формирования пола, развития половой системы и репродукции человека

Черных В.Б.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ, Москва
e-mail: chernykh@med-gen.ru

Стремительное развитие геномных технологий, в первую очередь хромосомного микроматричного анализа (ХМА) и секвенирования нового поколения (NGS), привело к значительному расширению возможностей молекулярной диагностики различных мутаций/генетических вариантов. В последние годы начато использование новых методов анализа генома в различных областях медицинской генетики, в том числе при обследовании пациентов с нарушениями формирования пола, развития половой системы, репродуктивной функции, для исследования abortивного материала самопроизвольно прервавшихся беременностей, а также в преимплантационной генетической диагностике. Представленный обзор посвящен результатам геномных исследований в репродуктивной генетике и их место в медико-генетическом обследовании пациентов с нарушением репродукции.

Ключевые слова: хромосомный микроматричный анализ, секвенирование нового поколения), вариации числа копий, генные мутации/варианты, нарушение формирования пола, бесплодие, невынашивание беременности.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Genomic technologies in the diagnosis of disorders of sex differentiation, development of the reproductive system and human reproduction

Chernykh V.B.^{1,2}

¹ Research Centre for Medical genetics, Moscow

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
e-mail: chernykh@med-gen.ru

The rapid development of genomic technologies, especially chromosomal microarray analysis and new-generation sequencing, has led to significant opportunities for the molecular diagnosis of various mutations/genetic variants. In recent years, there is initiated the widespread using of new methods of genome analysis in various topics of medical genetics, including the evaluation of patients with disorders of sex differentiation, abnormal development of the reproductive system, failures of reproductive function, studies of abortion material of spontaneous interrupted pregnancies, as well as in preimplantation genetic diagnosis. The presented review covers the results of genome research in reproductive genetics and their place in genetic evaluation of patients with reproductive disorders.

Key words: chromosomal microarray analysis (CMA), next-generation sequencing (NGS), copy number variation (CNV), gene mutations/variants, disorders of sexual differentiation (DSD) and development, infertility, pregnancy loss.

Введение

Генетические нарушения являются основными причинами аномалий формирования пола и развития половой системы, тяжелых форм бесплодия у мужчин и женщин, а также большинства случаев репродуктивных потерь. Кроме того, описано большое количество генетических факторов ассоциированных (связаны) с различными нарушениями развития или функции репродуктивной системы у человека. Их наличие может предрасполагать к снижению фертильности, бесплодию, невынашиванию беременности. Нарушения развития и функции органов репродуктивной системы отмечены у пациентов с различными наследственными заболеваниями и генетическими синдромами [1].

Актуальность генетического обследования пациентов с нарушениями репродуктивной сферы несомненна в связи с высокой частотой бесплодия и потерь бере-

менности (до 15–20%). Несмотря на значимую роль генетических и эпигенетических факторов в репродукции человека, генетическая диагностика причин аномалий полового развития, бесплодия, невынашивания беременности остается недостаточно эффективной в связи с крайне высокой этиологической гетерогенностью нарушений репродуктивной системы [1–7].

Причинами и факторами нарушений развития и функции репродуктивной системы являются различные генетические и эпигенетические изменения у пациентов, в их половых клетках и/или в формирующихся эмбрионах [1–13]. Степень влияния этих изменений на репродуктивную систему и фертильность зависит от типа мутации/изменения генома, а также их происхождения, количества клеток, несущих изменения (в случае мозаицизма и химеризма), генетического фона, действия средовых и других факторов. Генетическими факторами

нарушения репродукции могут быть как герминативные, так и постзиготические, мозаичные мутации; они могут затрагивать различные уровни генома: геномный или хромосомный (числовые и структурные мутации хромосом, микроструктурные перестройки, вариации числа копий — CNV, copy number variation), генный (различные типы генных мутаций/вариантов), эпигенетические изменения (аномалии инактивации X-хромосомы и геномного импринтинга, «незрелый хроматин» в сперматозоидах, изменение состава некодирующих РНК в гаметах/эмбрионе). Мутации могут затрагивать как половые хромосомы, так и аутосомы, а также митохондриальный геном. Аномалии/мутации половых хромосом занимают ведущее место в структуре генетически обусловленных форм патологии репродуктивной системы и связаны с гоносомными синдромами и другими синдромальными, а также несиндромальными нарушениями репродукции человека [1—3, 5].

Для многих генетически обусловленных аномалий развития и нарушений функции репродуктивной системы характерна первичность нарушения фертильности (первичное бесплодие). В частности, первичное бесплодие, неподдающееся лечению, характерно для нарушений дифференцировки пола, таких, как дисгенезия гонад, овотестикулярная и 46,XX-тестикулярная формы нарушений формирования пола (НФП), тяжелых форм нарушения гаметогенеза и гипогонадизма (секреторной азооспермии, синдрома преждевременной недостаточности яичников, СПНЯ). Стойкое первичное бесплодие, неподдающееся консервативному лечению, а в ряде случаев не преодолеваемое и методами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО, ICSI), может быть обусловлено нарушением дифференцировки гонад, тяжелыми формами поражения гаметогенеза, морфологическими/ультраморфологическими аномалиями мужских и женских гамет [6]. Однако при ряде генетических нарушений репродукции возможно, как первичное, так и вторичное бесплодие, невынашивание беременности и/или снижение фертильности (например, у носителей робертсоновских и реципрокных транслокаций, некоторых инверсий, сверхчисленных маркерных хромосом).

Молекулярно-генетическая диагностика наиболее успешна для синдромальных форм нарушений репродукции, обусловленных генными мутациями, особенно моногенных, дигенных или олигогенных нарушений формирования пола и развития половой системы вследствие дефектов продукции, метаболизма или действия гонадотропных и половых гормонов, антимюллерова гормона (например, дефицит 21-гидроксилазы, синдром тестикулярной феминизации, синдром персистенции мюллерова протока, муковисцидоз, синдром СBAVD). Несиндромальные генетические нарушения фертильности, связанные с генными мутациями и CNV, в большинстве случаев остаются неустановленными из-за отсутствия или слабой представленности мажорных мутаций в их генетической структуре. Исследование мута-

ций/генетических вариантов отдельных генов и генных панелей в клинически неотобранных группах пациентов с нарушением фертильности (бесплодием или невынашиванием беременности) неэффективно. Вследствие выраженной генетической гетерогенности значительное количество мутаций не удастся выявить при «стандартном» медико-генетическом обследовании, поэтому их диагностика требует использования комплексного генетического обследования, в том числе полногеномного анализа [5]. Последний может быть выполнен после стандартного (рутинного) генетического обследования (например, пациентов с дисгенезией гонад, овотестикулярным НФП, мужчин с бесплодием и патозооспермией, пациенток с аменореей), либо рекомендован как исследование первой линии при подозрении на гетерогенные нарушения репродукции, вызванные генными мутациями (например, синдромальные формы аномалий гамет, синдром первичной цилиарной дискинезии).

Современные молекулярные технологии анализа генома: от научных исследований к генетической диагностике

Стремительное развитие молекулярных технологий исследования генома, их широкое внедрение в медицинскую генетику значительно расширили возможности цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики. Различные методы анализа генома, транскриптома, РНК-ома, эпигенома все чаще используют не только с научно-исследовательской целью, но и в клинической практике, в диагностике различных наследственных заболеваний, генетических и эпигенетических нарушений. Использование хромосомного микроматричного анализа (ХМА) — сравнительной геномной гибридизации на чипах (Chromosomal Microarray Analysis, array CGH, Comparative Genomic Hybridization), технологий секвенирования ДНК нового поколения (NGS, Next Generation Sequencing), типирование однонуклеотидных полиморфных вариантов (single nucleotide polymorphism/variant, SNP/SNV), анализа метилома и других полногеномных или широкогеномных методов исследований в значительной мере повысило эффективность детекции анеуплоидий/анеусомий, несбалансированных структурных перестроек (микроделеций, микродупликаций, инсерций, хромотрипсиса), различных генных мутаций/вариантов, поиска кандидатных генов, однородительских дисомий (ОРД), потери гетерозиготности, эпигенетических нарушений.

Поскольку большинство наследственных заболеваний вызвано генными мутациями, анализ кодирующих последовательностей генома (экзома) достаточен для определения подавляющего большинства патогенных мутаций. С 2007 года начато применение массового параллельного секвенирования ДНК для детекции мутаций, вызывающих редкие наследственные заболевания, для скрининга анеуплоидий в преимплантационной (ПГД) и пренатальной генетической диагностике [9].

В последние несколько лет методы геномного анализа все шире используются в исследованиях и диагностике нарушений развития и функции репродуктивной системы, репродукции человека [5] для генетического обследования пациентов с аномалиями формирования пола, развития половой системы, гипогонадизмом, нарушением гаметогенеза и репродуктивной функции (бесплодием, привычным невынашиванием беременности), исследования материала самопроизвольно прервавшихся беременностей — спонтанных выкидышей, замерших беременностей, анэмбрионии и других аномалий развития эмбриона/плода, а также при проведении ПГД и пренатальной генетической диагностики [7, 10–27].

Геномные технологии в диагностике нарушений формирования пола и развития половой системы

Дефекты развития половой системы у человека часто приводят к нарушениям репродуктивной функции, снижению или полному отсутствию фертильности (стерильности). Аномалии половой дифференцировки, НФП представляют собой обширную гетерогенную группу врожденных заболеваний/пороков, сопровождающихся аномалиями формирования пола и развития половой системы, которые могут затрагивать генетический (хромосомный), гонадный, анатомический и/или гормональный уровень пола, половую аутоидентификацию [28]. Для них характерны выраженный полиморфизм фенотипов и генетическая гетерогенность, большое количество клинических форм НФП, поэтому для многих из них генетическая диагностика без выполнения дополнительных генетических исследований имеет недостаточную эффективность [18]. В целом успешность обнаружения причин НФП не превышает 15%, при этом большинство из диагностированных мутаций представляют собой мутации половых хромосом [7, 28].

Частота встречаемости аномалий строения половых органов составляет в среднем 5 на 1000 новорожденных. У 3–4% новорожденных мальчиков отмечают крипторхизм, у 75% пациентов с неправильным строением половых органов — гипоспадию [1]. Около 80% детей с атипичным строением гениталий имеют нормальный мужской кариотип (46,XY), у 10–15% пациентов выявляют нормальный женский кариотип (46,XX), у остальных — хромосомные аномалии, представленные преимущественно мутациями половых хромосом (гоносом) в регулярной или мозаичной форме [1–3]. Согласно международному Консенсусу предложено классифицировать все аномалии пола на гоносомные НФП (обусловленные мутациями половых хромосом), 46,XX НФП и 46,XY НФП [28]. Более 90% случаев 46,XX НФП вызвано избыточной продукцией андрогенов вследствие недостаточной активности 21-гидроксилазы, приводящей к врожденной дисфункции (гипертрофии) коры надпочечников (ВДКН, congenital adrenal hyperplasia,

САН). Частота данного аутосомно-рецессивного НФП составляет 1 на 10000–14000 новорожденных. В отличие от группы 46,XX НФП, структура группы 46,XY НФП более сложна, не имеет столь выраженных «мажорных» форм и часто обусловлена аномалиями дифференцировки гонад, нарушением продукции или действия половых или гонадотропных гормонов [7, 28].

Выполнение стандартного цитогенетического исследования (анализа кариотипа в лимфоцитах периферической крови) в большинстве случаев позволяет определить группу НФП у пациентов с аномалиями пола. По необходимости, например, при уточнении/верификации гоносомного мозаицизма, хромосомных перестроек, он может быть дополнен FISH или ПЦР-анализом половых хромосом. При аномалиях формирования пола, связанных с несоответствием кариотипа фенотипу, в частности при XY-дисгенезии гонад, овотестикулярной и 46,XX-тестикулярной форме НФП, вторым этапом генетического исследования часто является анализ гена *SRY* (*Sex-determining Region Y*), реже — других генов, вовлеченных в дифференцировку пола (*SOX9*, *NR5A1*, *NROB1*, *AR* и др.). Однако в 65–70% случаев НФП и аномалий развития половой системы, не вызванных мутациями гоносом, рутинное генетическое обследование не позволяет выявить их причину [7].

С начала 2000-х годов начато использование анализа панелей генов, вовлеченных в дифференцировку пола и в контроль полового развития при медико-генетическом обследовании пациентов с НФП с использованием общепринятых молекулярно-генетических методов (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру), а в последние годы — методом NGS, при необходимости дополняя их мультиплексной лигазной амплификацией (MLPA) или ХМА (aCGH) [18, 18, 19, 29–31]. Проведение полноэкзомного или полногеномного анализа позволяет повысить результативность (эффективность) генетической диагностики НФП в целом на 25–40%, то есть не менее чем в 2–3 раза [19, 29–31]. В наиболее крупном из опубликованных геномных исследований обследовано 326 пациентов (278 больных — с 46,XY НФП и 48 пациентов — с 46,XX НФП) [31]. Авторами проведен анализ панели из 64 генов с известной ролью в возникновении нарушений формирования пола и дополнительно 967 кандидатных генов, отобранных по результатам биоинформатического анализа. В группах с 46,XY НФП и 46,XX НФП генетические причины выявлены у 43% и 17% пациентов соответственно. Наиболее высокий процент выявления мутации был у 46,XY пациентов с НФП вследствие дефицита продукции или действия андрогенов [31].

Методы геномного анализа успешно используют для выявления генетических нарушений полового созревания, гипогонадотропного гипогонадизма. При секвенировании панели из 261 гена, вовлеченного в гипоталамический, гипофизарный и/или обонятельный пути, идентифицированы две новые мутации гена *FGFR1*, определены 18 новых кандидатных генов, связанных

с развитием гипогонадотропного гипогонадизма и синдрома Кальмана: *AMN1*, *CCKBR*, *CRY1*, *CXCR4*, *FGF13*, *GAP43*, *GLI3*, *JAG1*, *MASTL*, *NOS1*, *NOTCH1*, *NRP2*, *PALM2*, *PDE3A*, *PLEKHA5*, *RD3*, *TRAPPC9* и *TSPAN11* [32]. В них обнаружены различные мутации/варианты последовательности ДНК, классифицированные как патогенные или вероятно патогенные. У некоторых пациентов выявлены 'дигенные' варианты с наличием мутаций в двух различных генах.

Геномные технологии в диагностике бесплодия и невынашивания беременности

Нарушения репродукции представляют собой огромную, чрезвычайно гетерогенную по этиологии, патогенезу, фенотипическим проявлениям, группу заболеваний и состояний, связанных с проблемами деторождения (бесплодие, невынашивание, патология беременности), с нарушением фертильности у одного или обоих супругов. Генетические факторы могут играть ведущую роль в их этиологии (генетически обусловленные формы бесплодия, невынашивания или снижения фертильности), либо составлять генетический фон, предрасполагающий к их развитию (многофакторные нарушения репродукции). Результаты использования новых молекулярных методов исследования генома в изучении нарушений репродукции у мужчин, в том числе изменений копий генов Y-хромосомы, приведены в недавнем обзоре литературы [5].

Одними из наиболее исследованных микроструктурных вариантов генома при бесплодии являются несбалансированные перестройки половых хромосом (X и Y, CNV при этом, как правило, возникают вследствие микроделений и микродупликаций. В целом, микроделении чаще, чем дупликации оказывают негативное влияние на сперматогенез и мужскую фертильность. Самыми частыми из них являются микроделении длинного плеча Y-хромосомы в локусе Yq11.21-q23 [5, 33–35]. Они приводят к утрате одного, двух или всех трех регионов AZF (azoospermia factor, «фактора азооспермии»: AZFa, AZFb, AZFc), содержащих большинство Y-сцепленных генов, контролирующих сперматогенез. Полные делеции, целиком удаляющие 1–3 региона AZF, приводят к выраженному угнетению сперматогенеза, вплоть до секреторной азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени [33]. Неполные AZF-делеции, как правило, частично затрагивающие AZFc и/или AZFb регионы, характеризуются вариабельностью состояния сперматогенеза и показателей спермограммы у их носителей (от нормозооспермии, олигозооспермии различной степени, астено-/тератозооспермии и азооспермии), что обусловлено потерей части копий генов (*DAZ*, *CDY1*, *VCY*, *RBMY* и других) регионов AZFb и/или AZFc [5, 33–35].

Совсем недавно проведено исследование гена *RBMY1* (из региона AZFb) и показателей спермограммы

у 564 мужчин с патозооспермией (с олигозооспермией, $n = 72$, с астенозооспермией, $n = 144$, с олигоастенозооспермией, $n = 348$), 506 — с нормозооспермией и 486 фертильных мужчин [36]. У 59,5% обследованных мужчин выявлено наличие 6 копий гена *RBMY1*, у остальных — меньшее ($n = 2–5$, 18,5% мужчин) или большее ($n = 7–10$, 22% мужчин) их количество. Показано, что число копий гена *RBMY1* прямо коррелирует с подвижностью сперматозоидов. У мужчин, имеющих от 2 до 5 его копий, чаще отмечена сниженная подвижность сперматозоидов (астенозооспермия) по сравнению с мужчинами, имеющими 6 копий гена и более [36].

Помимо микроделений эухроматиновой области длинного плеча Y-хромосомы, а также вариации числа мультикопийных X- и Y-сцепленных генов, имеющих тестис-специфичную экспрессию и вовлеченных в контроль спермато- и спермиогенеза (*TSPY*, *DAZ*, *CDY*, *RBMY1*, *VCX/VCY*), частыми микроструктурными перестройками гоносом, которые связаны с нарушением гаметогенеза и бесплодием, являются CNV хромосом X и Y (микроделении и микродупликации), располагающиеся в псевдоаутосомных (*PAR*, *pseudoautosomal region*) областях, преимущественно в *PAR1* [37–39]. Их наличие может изменить копийность и активность располагающихся в них или поблизости генов, нарушить прохождение мейоза, конъюгацию и рекомбинацию хромосом, приводя к выраженному нарушению сперматогенеза, вплоть до секреторной (необструктивной) азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени.

В целом, частота встречаемости генетических нарушений репродукции у пациентов с патологией половой системы напрямую зависит от ее тяжести, поэтому генетическая диагностика наиболее эффективна при НФП, тяжелых формах бесплодия, выраженном нарушении сперматогенеза (синдром «только клетки Сертоли», блок сперматогенеза) и оогенеза (СПНЯ), генетически обусловленных дефектах гамет (глобулозооспермия, «синдром неподвижных ресничек», отсутствие или гипоплазия прозрачной оболочки ооцита и др.). Гемизиготные мутации X-сцепленного гена (*TEX11*) обнаружены у мужчин с блоком сперматогенеза в профазе I мейоза [40]. При анализе панели из 25 генов, связанных со сперматогенезом, у 13 из 40 (32,5%) пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией обнаружены патогенные или возможно патогенные генетические варианты и/или CNV, в том числе мутация X-сцепленного гена *TEX11* (с.A511G, Met171Val) и три CNV (Yq11.222-223, Xp22.12, Xq24) в гемизиготном состоянии, остальные варианты (SNP и CNV) — в гетерозиготном состоянии [24]. У двух из 13 пациентов обнаружена мутация с.346-1G>A гена *SOHLH1*, который, как показано ранее, у мужчин вызывает необструктивную форму азооспермии, а у женщин — дефекты развития фолликулов и созревания ооцитов [41]. В итоге у 5 из 40 (12,5%) пациентов выявлены патогенные мутации, у 8 — возможно патогенные варианты [24].

Генетические причины, связанные не с хромосомными и частыми генными нарушениями репродукции у женщин, изучены в меньшей степени, чем у мужчин. В значительной мере это обусловлено трудностями получения женских половых клеток для исследования оогенеза и фолликулогенеза у человека [42]. Изучение биологических, эндокринных и генетических аспектов овариогенеза, фолликулогенеза, созревания ооцитов выявило сложность и «уязвимость» этих процессов, для действия различных негативных факторов, значительную гетерогенность этиологии и патогенеза, в том числе многообразие генетически обусловленных нарушений. Для многих пациенток с нарушением репродуктивной функции характерен сниженный овариальный резерв [42].

Одной из тяжелых форм женского бесплодия является СПНЯ. Данное этиологически гетерогенное нарушение оогенеза характеризуется преждевременным наступлением менопаузы (ранее 40 лет), аменореей, сопровождающейся повышенным уровнем ФСГ (более 40 МЕ/л), и встречается у 1% женщин репродуктивного возраста. Генетическими факторами развития СПНЯ являются структурные аномалии половых хромосом (преимущественно X-хромосомы), гоносомный мозаицизм (в том числе скрытый и гонадный), а также мутации и изменение числа копий аутосомных и X-сцепленных генов, контролирующих оварио- и фолликулогенез, созревание ооцитов. Описано около 50 мутаций в 9 кандидатных генах (*FSHR*, *LHCGR*, *NR5A1*, *NOBOX*, *FOXL2*, *FIGLA*, *BMP15*, *NANOS3* и *STAG3*), связанных с развитием СПНЯ [43, 44].

У 20 из 42 (47,6%) 46,XX пациенток с СПНЯ, обследованных методом ХМА, обнаружены 15 различных CNV на X-хромосоме, из них 8 являлись дупликациями, 14 — делециями [45]. Некоторые обнаруженные CNV располагались в полиморфных локусах, другие — в описанных ранее регионах и генах X-хромосомы: *PCDH19* (Xq13.3), *POF1B* (Xq21), *CENPI* (Xq22.1), *XNPEP2*,

UTP14A (Xq25). При анализе экспрессии кандидатных генов, связанных с развитием СПНЯ (*AIFM*, *BCORL1*, *XNPEP2*, *ZFX*, *RBMX2*, *USP9X*, *USP27X*, *UTP14A*, *CENPI*), выявлена пониженная их экспрессия у носительниц соответствующих CNV [45].

Исследование другой выборки из 60 пациенток с СПНЯ методом ХМА позволило обнаружить 263 CNV (146 делеций и 117 дупликаций) размером от 20 т.п.н. до 3,6 млн п.н. [46]. После исключения 244 CNV, описанных в базе DGV (the Database of Genomic Variants <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), 19 CNV определены как значимые, их частота составила 7,2%. Выявленные кандидатные аутосомные локусы и гены для СПНЯ приведены в таблице.

Поскольку в структуре генетически обусловленного СПНЯ не выявлено мажорного гена или мутации, выполнение секвенирования широкой панели генов или экзозома/генома позволяет существенно повысить результативность поиска мутаций. Fonseca с соавторами выполнили секвенирование кодирующих областей 70 кандидатных генов, связанных с развитием СПНЯ [43]. Обследовано 12 пациенток с несиндромальной формой СПНЯ неясного генеза, имевших нормальный женский кариотип (46,XX). Контрольную группу составила 521 здоровая женщина, в том числе 176 женщин с менопаузой после 50 лет. У 3 из 12 пациенток выявлены патогенные или возможно патогенные мутации. Идентифицированы варианты в двух генах *ADAMTS19* (с.2828C/T, Thr943Ile) и *BMPR2* (с.2960C/T, Ser987Phe), вероятно, вызывающие СПНЯ, а также мутации гена *LHCGR* (с.296A/G, Ser176Pro), который, как ранее было показано, связан с развитием данного заболевания, а также со «слабым» ответом фолликулов на гормональную стимуляцию суперовуляции.

Лее с соавторами методом NGS провели анализ 83 генов, связанных с СПНЯ или с нарушением дифференцировки пола у 37 пациенток с аменореей [47]. У двух (5,4%) пациенток обнаружено наличие последо-

Таблица

Кандидатные аутосомные локусы и гены для СПНЯ (по Jaillard с соавторами [46] с модификацией)

Локус	Тип CNV	Положение на хромосоме (согласно сборке генома человека hg19)	Размер	Ген
1p13.31	Делеция	109.697.100-109.745.781	49 т.п.н.	<i>KIAA1324</i>
2q14.2q14.3	Дупликация	122.121.531-122.863.325	742 т.п.н.	<i>CLASP1</i>
2p23.3	Дупликация	26.557.453-27.116.447	559 т.п.н.	<i>CENP A</i>
5p14.3	Дупликация	Нет данных	968 т.п.н.	<i>DNAH5</i>
8p23.2	дупликация	2.308.926-5.935.998	3627 т.п.н.	<i>CSMD1</i>
9p13.3	Дупликация	34.206.594-34.391.999	185 т.п.н.	<i>KIF24</i>
10q26.31	Дупликация	135.254.039-135.377.532	123 т.п.н.	<i>SYCE1</i>
13q34	Дупликация	114.931.625-115.043.128	112 т.п.н.	<i>CDC16</i>
15q21.1	Дупликация	48.057.293-48.145.309	88 т.п.н.	<i>SEMA6D</i>
21q22.3	Делеция	43.762.549-43.985.429	223 т.п.н.	<i>RSPH1</i>

вательностей четырех Y-сцепленных генов (*SRY*, *TBL1Y*, *DDX3Y* и *RPS4Y2*), подтвержденное мультиплексной ПЦР-амплификацией и секвенированием по Сэнгеру. У 8 (21,6%) пациенток выявлены мутации: не описанная ранее нонсенс-мутация в гене *AR/HUMARA* и миссенс-мутации в генах *HSD17B4*, *DNAH5* и *WRN* [47].

Генетические факторы играют значимую роль не только в этиологии генетически обусловленных, но и многофакторных заболеваний репродуктивной системы, оказывают влияние на репаративные процессы, сохранение и восстановление фертильности при воздействии негативных средовых факторов. Одним из распространенных гинекологических заболеваний, часто сопровождающих нарушение репродуктивной функции, является эндометриоз. В его патогенез вовлечены различные гены и системы: метаболизм стероидных гормонов, иммунные, про-, противовоспалительные и ростовые факторы, рецепторная активность, клеточная адгезия, ангиогенез и другие биологические процессы [13]. Многочисленными исследованиями показана генетическая предрасположенность к развитию эндометриоза у носительниц определенных аллелей и генотипов, однако комплексные, геномные исследования свидетельствуют о значительно более сложном патогенезе эндометриоза и роли в нем генетических факторов, чем предполагали ранее. Не выявлены конкретные гены или мутации, которые вызывали эндометриоз, но отмечаемое при нем нарушение экспрессии различных кандидатных генов может быть вызвано изменением на генетическом (соматические мутации, мозаицизм, хромотрипсис) и эпигенетическом уровне (изменение метилирования ДНК, гетерохроматизация, изменение регуляторных микроРНК) [13]. Поэтому комплексные исследования генома на различных уровнях (хромосомном, геномном и эпигенетическом) в различных типах клеток, органах и тканях являются перспективными в изучении природы как генетических, так и многофакторных заболеваний репродуктивной системы.

Геномные технологии

в преимплантационной и пренатальной диагностике

Хромосомные мутации являются основной причиной нарушений развития эмбриона и потерь беременности, и встречаются в 50–60% всех случаев прерывания клинически зафиксированных беременностей у человека [4, 8, 9], поэтому актуальность выполнения генетических исследований в установлении причин бесплодия, невынашивания беременности (спонтанных аборт, замерших беременностей, анэмбрионии) не ослабевает. Молекулярные методы анализа генома (ХМА/аCGH, NGS, SNP-типирование, полногеномная амплификация, анализ метилома и др.) нашли широкое применение и успешно используются в ПГД, в инвазивной пренатальной генетической диагностике, а также в неинвазивной пренатальной диагностике (NIPT) [14–17, 22,

48, 49]. Новым направлением в ПГД (в качестве альтернативы исследования клеток трофобластической оболочки) является анализ внеклеточной ДНК эмбриона, полученной из жидкости бластоцисты — «неинвазивная» ПГД [14, 15]. Детекция полных и сегментных анеуплоидий по всем хромосомам — преимплантационный генетический скрининг (ПГС) позволяет улучшить генетический отбор эмбрионов в программах ЭКО/ICSI, увеличить частоту имплантации, наступления и сохранения беременности, что особенно актуально у носителей аномалий кариотипа, для супружеских пар позднего репродуктивного возраста.

Геномные исследования позволяют проводить поиск CNV и кандидатных генов, ответственных за самопроизвольное прерывание беременности, изучать эпигенетику нормального и патологического развития эмбриона/плода. Результаты данных исследований свидетельствуют о повышенной частоте аномалий импринтинга и нарушений эпигенетических модификаций в гаметах пациентов с нарушением фертильности, в аномально развивающихся эмбрионах и самопроизвольно прерванных беременностях [4, 10–12]. Предполагают, что до 40% случаев самопроизвольных прерываний беременности может быть связано с генными мутациями, влияющими на морфогенез и жизнеспособность плода, патогенными CNV и эпигенетическими нарушениями у эуплоидных эмбрионов, а также различными генетическими факторами, предрасполагающими к снижению фертильности и повышению риска невынашивания со стороны женского организма [9–11, 17, 20–23, 25–27].

Chen с соавторами исследовали биологический материал (биоптаты ворсин хориона, пуповинная кровь) от 2186 самопроизвольно прервавшихся беременностей методами высокоразрешающего ХМА ($n = 376$) и полногеномного (WGS) секвенирования ($n = 1810$) [49]. В 45% образцов обнаружены CNV, в том числе в 776 образцах продуктов зачатия естественным путем и в 41 образце — после ЭКО. Из них в 26,5% случаев отмечено самопроизвольное прерывание беременности в I триместре, в 35,6% случаев — во II триместре и в 37,9% случаев — в III триместре. CNV обнаружены в 817 (45%) образцах, исследованных методом WGS, и в 112 из 376 (30%) образцов, исследованных ХМА, комбинированно — в 929 (42,5%) всех исследованных образцов. Среди обнаруженных CNV в 47,3% случаях диагностированы трисомии аутосом, в 10,1% — мозаицизм по аутосомам, моносомия X — 9,9%, в 8,9% — полиплоидия. В целом выявлено 130 CNV в группе образцов, исследованных методом WGS, и 24 — в группе образцов, исследованных ХМА. Большинство из обнаруженных вариантов являлись перестройками *de novo*, и находились в гетерозиготном состоянии, наиболее часто в хромосомах 22 и 18, реже — в хромосомах X и 8. Размер выявленных делеций был существенно меньшим, чем дупликаций, в среднем составляя 7,64 млн п.н. (10,72–18,58 млн п.н.) для делеций и 22,67 млн п.н. (23,41–41,49 млн п.н.) для дупликаций.

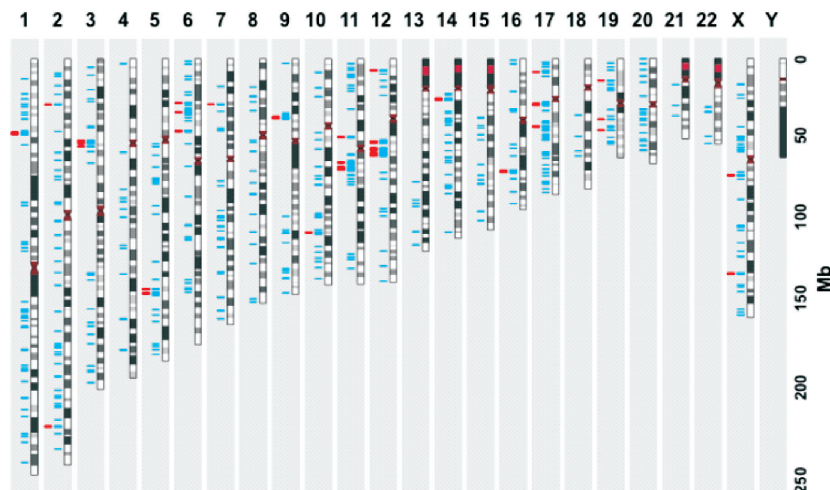
дупликаций. При этом их размер был значимо больше, чем размер CNV, обнаруживаемых у здоровых индивидов, большинство из которых составляют менее 1 млн п.н. Выявлена некоторая зависимость количества случаев невынашивания беременности от типа анеуплоидии. Так, число потерь беременности прямо связано с частотой встречаемости полиплоидии и обратно — анеуплоидии по гомосомам. Частота делеций и дупликаций не коррелировала с количеством самопроизвольно прерванных беременностей. Хотя более крупные делеции обнаружены у женщин с неоднократными случаями невынашивания, различия не достигли уровня статистической значимости. При биоинформатическом анализе 154 обнаруженных CNV выделены 275 генов, мутации которых могут быть связаны с прерыванием беременности. При мутациях в 206 из них описаны аномалии эмбрионального развития, нарушение функции 84 из 206 генов может приводить к внутриутробной гибели у млекопитающих [49]. Расположение данных генов на хромосомах человека имеет кластерный характер, при этом 66 генов располагаются в 31 локусе различных аутосом (рисунок). Значительная часть выявленных кандидатных генов кодирует транскрипционные факторы, содержащие гомеодомен (*HOX*, *NKX*), домен «завиток-петля-завиток» bHLH (*HAND2*, *NEUROG2* и *NEUROD1*) или протеин-киназный домен.

Компаунд-гетерозиготные мутации генов *DYNC2H1* и *ALOX15* обнаружены в двух семьях с привычным невынашиванием беременности [23]. Ген *DYNC2H1* вовлечен в формирование ресничек, и его мутации связаны с внутриутробной гибелью эмбриона. Ген *ALOX15* экспрессируется в плаценте и нарушение его регуляции связано с воспалением, оксидативным стрессом, нарушением ангиогенеза и функции плаценты [23]. Определенные однонуклеотидные варианты (SNV) и мелкие инсерции и делеции (indel), обнаруженные у пациентов

с привычным невынашиванием беременности, с повышенной (по сравнению со здоровыми женщинами) частотой встречаются в локусах, содержащих гены, вовлеченные в контроль системы комплемента, свертывающей и противосвертывающей систем крови, а также в патогенез цилиопатий [50].

Заключение

Результаты анализа генома человека наглядно свидетельствуют о том, что новые молекулярные методы и технологии могут быть успешно применены как с научно-исследовательской целью, так и для диагностики различных генетических и эпигенетических нарушений. Проведение полногеномного или полноэкзомного анализа в медико-генетическом обследовании пациентов с НФП, бесплодием, привычным невынашиванием беременности существенно повышает эффективность выявления генетических причин нарушений репродукции человека, успешность дифференциальной диагностики, медико-генетического консультирования, прогноза, облегчает выбор лечения, решения вопроса о преодолении проблем деторождения. Необходимо более широкое использование новых молекулярных методов в репродуктивной генетике, рациональное их сочетание с стандартными (рутинными) методами исследования, однако следует учитывать низкую эффективность полногеномного/экзомного анализа в неотобранных группах пациентов с нарушением репродукции. Системный подход в исследовании различных мутаций/вариаций генома, их сочетаний и связи с фенотипическими проявлениями на различных уровнях организма (органном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном) необходим для комплексной оценки их значимости в нарушении репродуктивной системы и фертильности.



Локализация 712 генов, связанных с развитием эмбриона (указаны голубым цветом) и их кластеров (указаны красным цветом), содержащих ≥ 4 гена, связанных с морфогенезом, на хромосомах человека (номера хромосом 1—22 указаны сверху, X и Y — половые хромосомы), справа шкала размера хромосом в млн п.н. (по Chen с соавторами [49]).

Список литературы

1. Курило Л.Ф., Андреева М.В., Коломиец О.В., Сорокина Т.М., Черных В.Б. и др. Генетические синдромы с нарушениями развития органов половой системы // Андрология и генитальная хирургия. 2013. Т. 14. №4. С. 17-27.
2. Курило Л.Ф. Аномалии развития половой системы вследствие генных мутаций // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. Т. 10. № 2. С. 58-65.
3. Курило Л.Ф. Хромосомные заболевания органов половой системы // Клиническая и экспериментальная морфология. 2015. Т. 13. № 1. С. 48-59.
4. Лебедев И.Н. Эпигенетические аспекты нарушений эмбрионального развития человека // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 3. С. 15-19.
5. Черных В.Б., Яманди Т.А., Сафина Н.Ю. Новые молекулярные технологии в диагностике генетических причин мужского бесплодия // Андрология и генитальная хирургия. 2017. Т. 18. №1. С. 10-22.
6. Брагина Е.Е., Сорокина Т.М., Арифалин Е.А., Курило Л.Ф. Генетически обусловленные формы патозооспермии. Обзор литературы и результаты исследований // Андрология и генитальная хирургия. 2015. Т. 16. № 3. С. 29-39.
7. Alhomaidah D., McGowan R., Ahmed S.F. The current state of diagnostic genetics for conditions affecting sex development // Clin. Genet. 2017. V. 91. №2. P. 157-162.
8. Баранов В.С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. СПб: Издательство Н-Л, 2006. 640 с.
9. Никитина Т.В., Лебедев И.Н. Цитогенетика привычного невынашивания беременности // Генетика. 2014. Т. 50. № 5. С. 501-514.
10. Саженова Е.А., Лепшин М.В., Лебедев И.Н. Множественные эпимутации импринтома при нарушении репродукции человека // Медицинская генетика. 2014. Т. 13. № 3 (141). С. 19-27.
11. Саженова Е.А., Скрыбин Н.А., Суханова Н.Н., Лебедев И.Н. Мультилокусные эпимутации импринтома при патологии эмбрионального развития человека // Молекулярная биология. 2012. Т. 46. № 2. С. 204-213.
12. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., Parfenyev S.E., Mekina I.D. et al. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality // Oncotarget. 2017 Jun 1. doi: 10.18632/oncotarget.18331
13. Baranov V.S., Ivaschenko T.E., Liehr T., Yarmolinskaya M.I. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015. V. 185. P. 59-65.
14. Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Артюхова В.Г., Светлаков А.В., Лебедев И.Н. Преимплантационная генетическая диагностика на основе бластоцентеза: проблемы и перспективы // Генетика. 2016. Т. 52. № 1. С. 5-13.
15. Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Лебедев И.Н. Технологии молекулярно-генетического анализа на основе внеклеточных нуклеиновых кислот в пренатальной и преимплантационной генетической диагностике. В сб-ке: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике Новосибирск, 2015. С. 118-136.
16. Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Четчина Н.Н., Мельников А.А. и др. Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности // Медицинская генетика. 2013. Т. 12. № 1 (127). С. 26-35.
17. Bagheri H., Mercier E., Qiao Y., Stephenson M.D., Rajcan-Separovic E. Genomic characteristics of miscarriage copy number variants // Mol Hum Reprod. 2015. V. 21. P. 655-661.
18. Bashamboo A., Ledig S., Wieacker P., Achermann J.C., McElreavey K. New technologies for the identification of novel genetic markers of disorders of sex development (DSD) // Sex Dev. 2010. V. 4. №4-5. P. 213-224.
19. Baxter R.M., Arboleda V.A., Lee H., Barseghyan H., Adam M.P. et al. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development // J Clin Endocrinol Metab. 2015. V. 100. №2. E333-E344.
20. Bug S., Solfrank B., Schmitz F., Pricelius J., Stecher M. et al. Diagnostic utility of novel combined arrays for genome-wide simultaneous detection of aneuploidy and uniparental isodisomy in losses of pregnancy // Mol Cytogenet. 2014. V. 7. P. 43.
21. Filges I., Friedman J.M. Exome sequencing for gene discovery in lethal fetal disorders — harnessing the value of extreme phenotypes // Prenat Diagn. 2014. V. 35. №10. P. 1005-1009.
22. Hillman S.C., Willams D., Carss K.J., McMullan D.J., Hurlles M.E. et al. Prenatal exome sequencing for fetuses with structural abnormalities: the next step // Ultrasound Obstet Gynecol. 2015. V. 45. P. 4-9.
23. Qiao Y., Wen J., Tang F., Martell S., Shomer N., Leung P.C., Stephenson M.D., Rajcan-Separovic E. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss // Mol Hum Reprod. 2016. V. 22. №5. P. 364-372.
24. Nakamura S., Miyado M., Saito K., Katsumi M., Nakamura A. et al. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations // Andrology. 2017. V. 5. №4. P. 824-831.
25. Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W.P., Tyson C., Qiao Y. et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // Hum Reprod. 2010; V. 25. P. 2913-2922.
26. Rajcan-Separovic E., Qiao Y., Tyson C., Harvard C., Fawcett C. et al. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects // Mol Hum Reprod. 2010. V. 16. P. 125-134.
27. Viaggi C.D., Cavani S., Malacarne M., Floriddia F., Zerega G. et al. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH // J Appl Genet. 2013. V. 54. P. 353-359.
28. Hughes I.A., Houk C., Ahmed S.F., Lee P.A. Consensus statement on management of intersex disorders // Arch Dis Child. 2006. V. 91. №7. P. 554-563.
29. Tobias ES, McElreavey K. Next generation sequencing for disorders of sex development // Endocr Dev. 2014. V. 27. P. 53-62.
30. Dong Y., Yi Y., Yao H., Yang Z., Hu H. et al. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development // BMC Med Genet. 2016. V. 17. P. 23.
31. Eggers S., Sadedin S., van den Bergen J.A., Robeyska G., Ohnesorg T. et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort // Genome Biol. 2016. V. 17. №1. P. 243.
32. Quaynor S.D., Bosley M.E., Duckworth C.G. et al. Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome // Mol Cell Endocrinol. 2016. V. 437. P. 86-96.
33. Черных В.Б. AZF делеции — частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований. Проблемы репродукции. 2009. №1. С. 10-15.
34. Krausz C., Chianese C., Giachini C., Guarducci E., Lafaye I. et al. The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility // J Endocrinol Invest. 2011. V. 34. №5. P. 376-382.
35. Lo Giacco D., Chianese C., Sanchez-Curbelo J., Bassas L., Ruiz P. et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnos-

tic genetic laboratory // *Eur J Hum Genet.* 2014. V. 22. №6. P. 754-761.

36. Yan Y., Yang X., Liu Y., Shen Y., Tu W. et al. Copy number variation of functional RBMY1 is associated with sperm motility: an azoospermia factor-linked candidate for asthenozoospermia // *Hum Reprod.* 2017 May 12:1-11. doi: 10.1093/humrep/dex100.

37. Krausz C., Giachini C., Lo Giacco D., Daguin F., Chianese C. et al. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males // *PLoS One.* 2012. V. 7. №10. P. e44887.

38. Chianese C., Gunning A.C., Giachini C., Daguin F., Balercia G. et al. X chromosome-linked CNVs in male infertility: discovery of overall duplication load and recurrent, patient-specific gains with potential clinical relevance // *PLoS One.* 2014. V. 9. №6. P. e97746.

39. Lo Giacco D., Chianese C., Ars E., Ruiz-Castane E., Forti G. Et al. Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility // *J Med Genet.* 2014. V. 51. №5. P. 340-344.

40. Yatsenko A.N., Georgiadis A.P., Ropke A., Berman A.J., Jaffe T. et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men // *N Engl J Med.* 2015. V. 372. №22. P. 2097-2107.

41. Choi Y., Jeon S., Choi M., Lee M.H., Park M. et al. Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive azoospermia // *Hum Mutat.* 2010. V. 31. №7. P. 788-793.

42. Курило Л.Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих. Хронология и динамика развития гонад, гамет и фолликулов человека и млекопитающих животных. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012, 282 pp.

43. Fonseca D.J., Patino L.C., Suarez Y.C., de Jesus Rodriguez A., Mateus H.E. et al. Next generation sequencing in women af-

ected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations // *Fertil Steril.* 2015. V. 104. №1. P. 154-62.e2.

44. Laissue P. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing // *Mol Cell Endocrinol.* 2015. V. 411. P. 243-257.

45. Quilter C.R., Karcianas A.C., Bagga M.R., Duncan S., Murray A. et al. Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF) // *Hum Reprod.* 2010. V. 25. №8. P. 2139-2150.

46. Jaillard S., Akloul L., Beaumont M., Hamdi-Roze H., Dubourg C. et al. Array-CGH diagnosis in ovarian failure: identification of new molecular actors for ovarian physiology // *J Ovarian Res.* 2016. V. 9. №1. P. 63.

47. Lee Y., Kim C., Park Y., Pyun J.A., Kwack K. Next generation sequencing identifies abnormal Y chromosome and candidate causal variants in premature ovarian failure patients // *Genomics.* 2016. V. 108. V. 5-6. P. 209-215.

48. Soellner L., Begemann M., Degenhardt F., Geipel A., Eggermann T. et al. Maternal heterozygous NLRP7 variant results in recurrent reproductive failure and imprinting disturbances in the offspring // *Eur J Hum Genet.* 2017. V. 25. №8. P. 924-929.

49. Chen Y., Bartanus J., Liang D., Zhu H., Breman A.M. et al. Characterization of chromosomal abnormalities in pregnancy losses reveals critical genes and loci for human early development // *Hum Mutat.* 2017. V. 38. №6. P. 669-677.

50. Filges I., Nosova E., Bruder E., Tercanli S., Townsend K. et al. Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype // *Clin Genet.* 2014. V. 86. P. 220-228.