



Новые молекулярные технологии в диагностике генетических причин мужского бесплодия

В.Б. Черных^{1,2}, Т.А. Яманди³, Н.Ю. Сафина³

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1;

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ ФГБОУ ВО «Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, Делегатская ул., 20/1

Контакты: Вячеслав Борисович Черных chernykh@med-gen.ru

В последние годы стремительное развитие технологий в области молекулярной генетики и цитогенетики привело к значительному расширению возможностей исследования и диагностики различных изменений генома. В статье приведено краткое описание новых молекулярных технологий, результаты их использования в репродуктивной медицине, а также их перспективы в диагностике причин бесплодия у мужчин.

Ключевые слова: мужское бесплодие, сперматогенез, азооспермия, олигозооспермия, нарушение формирования пола, секвенирование нового поколения, хромосомный микроматричный анализ, вариации числа копий, генные мутации, однонуклеотидный полиморфизм

DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-1-10-22

New molecular technologies in genetic diagnosis of male infertility

V.B. Chernykh^{1,2}, T.A. Yamandi³, N. Yu. Safina³

¹ Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechie St., Moscow 115478, Russia;

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

³ A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; 20 Build. 1 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russia

In recent years, the accelerated development of technologies in the field of molecular genetics and cytogenetics has led to significant opportunities of the research and diagnosis of mutations and variations of the genome. This article provides a brief review of new molecular technology, also as the results of their use in reproductive medicine and their perspectives in the genetic diagnosis of male infertility.

Key words: male infertility, spermatogenesis, azoospermia, oligozoospermia, disorders of sex development, next-generation sequencing, array comparative genomic hybridization, copy number variation, gene mutations, single nucleotide polymorphism

Введение

Бесплодие является важной медико-социальной проблемой в связи с высокой частотой отсутствия беременности естественным путем, встречающегося в среднем у 15 % супружеских пар. В структуре проблем деторождения на долю «мужского фактора» приходится до 50 % случаев бесплодия в браке [1]. Нарушение фертильности отмечают у 5–7 % мужчин, при этом в 50–60 % случаев бесплодия в браке диагностируют снижение количественных и/или качественных показателей эякулята, что может быть обусловлено дефектами спермато- и/или спермиогенеза, созревания сперматозоидов в эпидидимисе, реже — нарушением проходимости семявыносящих путей, секреции придаточных мужских половых желез, эректильной дисфункцией [2].

Многочисленные исследования убедительно свидетельствуют о значимости генетических факторов в развитии и функции репродуктивной системы. По крайней мере 2500 генов человека вовлечены в эти процессы [3]. Генетические факторы являются главной причиной нарушения формирования пола и развития органов половой системы, тяжелых форм бесплодия и большинства случаев невынашивания беременности [4–7]. Не менее 30 % случаев тяжелых форм нарушения репродуктивной функции у мужчин обусловлены генетическими факторами [6, 7]. К наиболее значимым формам патозооспермии относят секреторную и obstructивную азооспермию, олигозооспермию тяжелой степени, а также выраженную астено-/тератозооспермию [2]. Частота хромосомных аномалий у мужчин



с бесплодием в среднем составляет 5–7 % и наиболее высока при азооспермии и олигозооспермии тяжелой степени (12–15 %), главным образом за счет синдрома Клайнфельтера и других аномалий половых хромосом [6–10].

Несмотря на принципиальную значимость генетических факторов для репродукции, в большом количестве случаев генетические нарушения фертильности, в том числе мужского и женского бесплодия, остаются недиагностированными. Особенно это касается генных мутаций и микроструктурных перестроек хромосом в связи с недостаточно широким использованием молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов исследования в практической медицине [7, 11–13].

В настоящее время генетическая диагностика причин мужского бесплодия, связанного с азооспермией или олигозооспермией, чаще всего «ограничена» стандартным цитогенетическим исследованием (анализ кариотипа по лимфоцитам периферической крови), детекцией микроделений хромосомы Y в локусе AZF (Azoospermia Factor, фактор азооспермии), анализом частых мутаций и IVS8-Tn полиморфизма гена муковисцидоза (*CFTR*) и исследованием количества CAG-повторов в экзоне 1 гена рецептора андрогенов (*AR/HUMARA*) [7, 11]. При нарушениях формирования пола и при аномалиях кариотипа генетическая диагностика может быть дополнена флуоресцентной гибридизацией *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) хромосом и молекулярно-генетическим исследованием мутаций частых генов (например, *SRY*, *AR*, *CYP21b*), связанных с нарушениями формирования пола и репродукции у человека. До недавнего времени широкое использование методов молекулярно-генетической диагностики в практической медицине в значительной мере было ограничено их технической сложностью и высокой стоимостью. Однако в последние годы стремительное развитие технологий в области молекулярной биологии и генетики, снижение их себестоимости, накопленные знания о генетике человека и развитие биоинформатики привели к значительному расширению возможностей для исследования генома, эпигенома, РНКома и протеома. Данные технологии могут быть использованы для молекулярной диагностики различных изменений генома, в том числе связанных с нарушением развития и функции репродуктивной системы [13]. Современные молекулярные методы исследования генома могут быть разделены на 2 основные группы: технологии, использующие микробиочипы, и технологии секвенирования, в первую очередь секвенирование ДНК нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS).

Хромосомный микроматричный анализ

В середине 1990-х годов появились технические возможности для изготовления биологических микро-

чипов, на небольшой площади которых размещены сотни и тысячи гибридизационных проб для нуклеиновых кислот, что позволило проводить одновременный анализ большого количества молекул ДНК и РНК. Разрешающая способность микрочипов зависит от плотности расположения, типа и длины, специфических олигонуклеотидных проб. Данные биомикрочипы могут быть использованы для анализа копийности участков генома с помощью хромосомного микроматричного анализа (ХМА, Chromosome Microarray Analysis, CMA) или сравнительной геномной гибридизации на чипах (array Comparative Genomic Hybridization, array-CGH, или aCGH) и широкогеномного SNP-типирования (определение однонуклеотидных замен, Single Nucleotide Polymorphism, SNP) [10, 12–15].

ХМА является новым молекулярно-цитогенетическим методом, позволяющим выявлять изменение (увеличение или уменьшение) числа копий хромосомных локусов в масштабе всего генома (см. таблицу). В настоящее время для него используют биочипы, представляющие собой матрицу с большим количеством (до нескольких сотен тысяч) точно нанесенных олигонуклеотидных последовательностей, перекрывающих весь геном или его отдельные участки (кастомные чипы). Анализируемую ДНК гибридизуют с подобным микрочипом; каждый сигнал соответствует определенному локусу генома, изменение интенсивности сигнала свидетельствует об изменении копийности того или иного участка хромосомы (рис. 1). Если предел разрешающей способности классического кариотипирования (при GTG-окрашивании) составляет около 550–650 бэндов на кариотип, т. е. приблизительно 5–10 млн пар нуклеотидов (п. н.), то чувствительность метода array-CGH способна достигать разрешения 5–10 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.), чувствительность ХМА на чипах высокого разрешения (High Resolution array-CGH, HR-aCGH) — до 200 п. н. и менее [10, 14]. Кариотип, определенный с помощью данного метода, получил название «молекулярный». С учетом высокой разрешающей способности предложено использовать ХМА в качестве генетического анализа первой линии, заменив стандартное цитогенетическое исследование (анализ кариотипа) при несиндромальных врожденных пороках развития и умственной отсталости неясного генеза, а также при подозрении на наличие микроделеционных и микродупликационных синдромов или других несбалансированных хромосомных aberrаций.

Следует отметить, что в отличие от других методов исследования, направленных на определение числа копий фрагментов генома/генов, ХМА не требует предварительных знаний о конкретном регионе и позволяет комплексно оценить картину повреждений на всех хромосомах ядерного генома: хромосомы 1–22 (аутосомы) и X, Y (половые хромосомы, или гоносомы). Еще одним существенным преимуществом технологии



Новые методы молекулярной диагностики мутаций и вариаций генома человека и области их применения.

Метод молекулярной диагностики/исследования	Принцип	Область применения	Возможности/преимущества	Ограничения/недостатки
Сравнительная геномная гибридизация на чипах (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) – хромосомный микроматричный анализ (ХМА)	Молекулярно-цитогенетический анализ хромосом с использованием микроматриц (чипов) для гибридизации с геномной ДНК или с отдельными ее фрагментами. Соотношение интенсивности гибридизации ДНК изменяется в зависимости от количества определенных фрагментов ДНК в геноме	Детекция несбалансированных изменений генома, вариация числа копий (Copy Number Variation, CNV). Постнатальная и пренатальная диагностика хромосомных болезней, в том числе микроделеционных и микродупликационных синдромов, скрининг эмбрионов на хромосомные аномалии (предимплантационная генетическая диагностика), генетическая диагностика злокачественных опухолей	Анализ всего (ядерного) генома на наличие полных и частичных анеуплоидий, в том числе его несбалансированных структурных и микроструктурных перестроек (делетий, дупликаций, инсерций)	Невозможно выявить сбалансированные перестройки хромосом (реципрокные и робертсоновские транслокации, инверсии), низкоуровневый мозаицизм, химеризм, тетраплоидию. Возможности детекции микроструктурных перестроек ограничены разрастающей способностью микроматрицы. Трудности интерпретации многих CNV из-за отсутствия сведений об их клинической (патогенной) значимости
Секвенирование ДНК нового поколения (Next Generations Sequencing, NGS)	Обобщенное название новых технологий секвенирования генома, позволяющих выполнять массивное параллельное секвенирование последовательностей ДНК с последующей их сборкой анализом	Секвенирование всего генома (полногеномное), его кодирующих регионов (полноэкзомное), отдельных фрагментов, локусов/генов (таргетное)	Возможность детекции различных генных мутаций (точковых и мелких делеций, дупликаций, инсерций), некоторых микроструктурных перестроек (микроделеций, микродупликаций), анеуплоидий	Невозможно детектировать сбалансированные мутации хромосом (за исключением некоторых микроструктурных), мозаицизм, химеризм. Ограниченные возможности детекции микроструктурных перестроек, некоторых участков генома
Однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)	Исследование панелей ДНК-полиморфизмов размером в 1 нуклеотид (A, T, G или C)	SNP-генотипирование по многим локусам генома, детекция протяженных участков потери гетерозиготности (изодисомии)	Диагностика предрасположенности к многофакторным заболеваниям и патологическим признакам, выявление однопородительских дисомий	Метод является исследовательским и не позволяет непосредственно проводить генетическую диагностику
Широкогеномное исследование ассоциаций (Genome-wide association study, GWAS)	Исследование связи генотипа с различными фенотипическими признаками в масштабе всего генома с помощью молекулярно-генетических исследования множества аллелей/локусов	Поиск локусов и генов, ответственных за развитие заболеваний и (патологических) признаков в масштабе всего генома	Выявление генов, локусов, мутаций, варианты которых связаны с развитием генетически обусловленных и многофакторных (полигенных) заболеваний	Метод является исследовательским и не позволяет проводить непосредственную генетическую диагностику. Предварительный этап поиска кандидатных генов для их последующего исследования

сравнительной геномной гибридизации является то, что для ее использования не требуется приготовления препаратов метафазных хромосом. Поэтому для ХМА могут быть использованы нежизнеспособные ткани и клетки, не имеющие пролиферативной активности, например, при спонтанных абортах, замерших беременностях. Недостаток данного метода состоит в том, что с его помощью невозможно детектировать сбалансированные хромосомные перестройки, изменение ploидности 4n (тетраплоидию), химеризм и низкоуровневый или невысокого уровня (<15–20 %) мозаицизм, а также некоторые участки генома, в частности центромерные и гетерохроматиновые регионы, фрагменты с высокой гомологией (см. таблицу). Широкое распространение ХМА в практической медицине

ограничено относительно высокой стоимостью микрочипов и трудностями клинической интерпретации получаемых результатов, особенно при использовании матриц высокого разрешения (HR-aCGH, high resolution array CGH). Это в первую очередь обусловлено тем, что в геноме человека присутствует значительное количество полиморфных участков ДНК с вариативной копийностью, значимость многих из которых неизвестна, следовательно, сложно интерпретировать результаты в клиническом отношении, необходимо обследовать родственников – родителей, сибсов [10, 14].

Вариация числа копий (Copy Number Variation, CNV) – фрагментов ДНК – отличается числом копий от репрезентативного, референсного (условно нормального) генома. В геноме человека описаны более

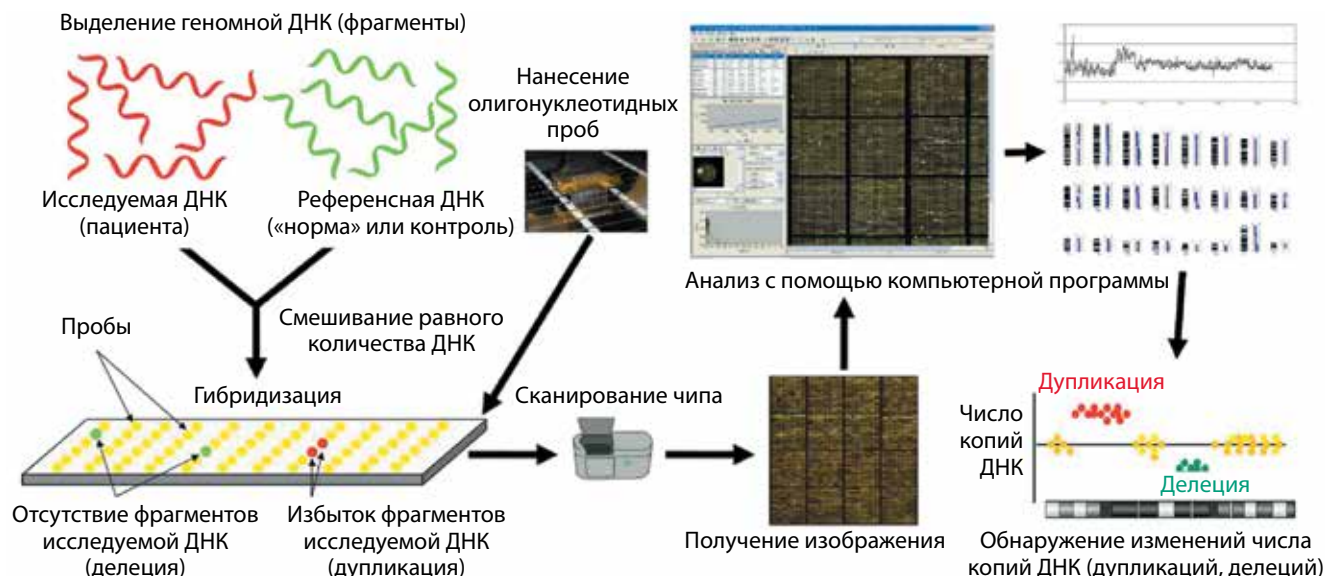


Рис. 1. Технология хромосомного микроматричного анализа (arrayCGH)

4000 участков CNV, причем 613 из них размером около 10^6 п. н. [10]. Частота возникновения *de novo* CNV у человека варьирует от $2,5 \times 10^{-6}$ до 1×10^{-4} на локус на 1 поколение в зависимости от локуса и размера CNV [14]. По данным одних авторов, участки, вариабельные по копияности, занимают около 12 % генома человека [14], по другим данным, CNV затрагивают более 3000 функциональных генов, причем для 800 CNV их частота в общей популяции превышает 3 % [15]. Уменьшенное или увеличенное количество копий генов может приводить к пониженной или повышенной экспрессии его продуктов — белков или некодирующих РНК (нкРНК), влияя на их функцию. Наличие в геноме CNV не подразумевает их обязательной клинической значимости, поэтому выделение патогенных и доброкачественных вариантов необходимо для подтверждения их связи с фенотипическими проявлениями [10, 14, 15]. Список полиморфных CNV в геноме человека с частотами и генами в области их влияния представлен в базе данных по вариантам генома человека Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

В последние годы получены данные о вариации числа копий в геноме человека как важном факторе генетического и фенотипического разнообразия. Результаты недавних исследований в области репродуктивной генетики свидетельствуют, что нарушение формирования пола и полового развития, мужское и женское бесплодие и невынашивание беременности могут быть связаны не только с хромосомными аномалиями, генными мутациями, но и с различными CNV и другими генетическими, а также эпигенетическими факторами [16–28].

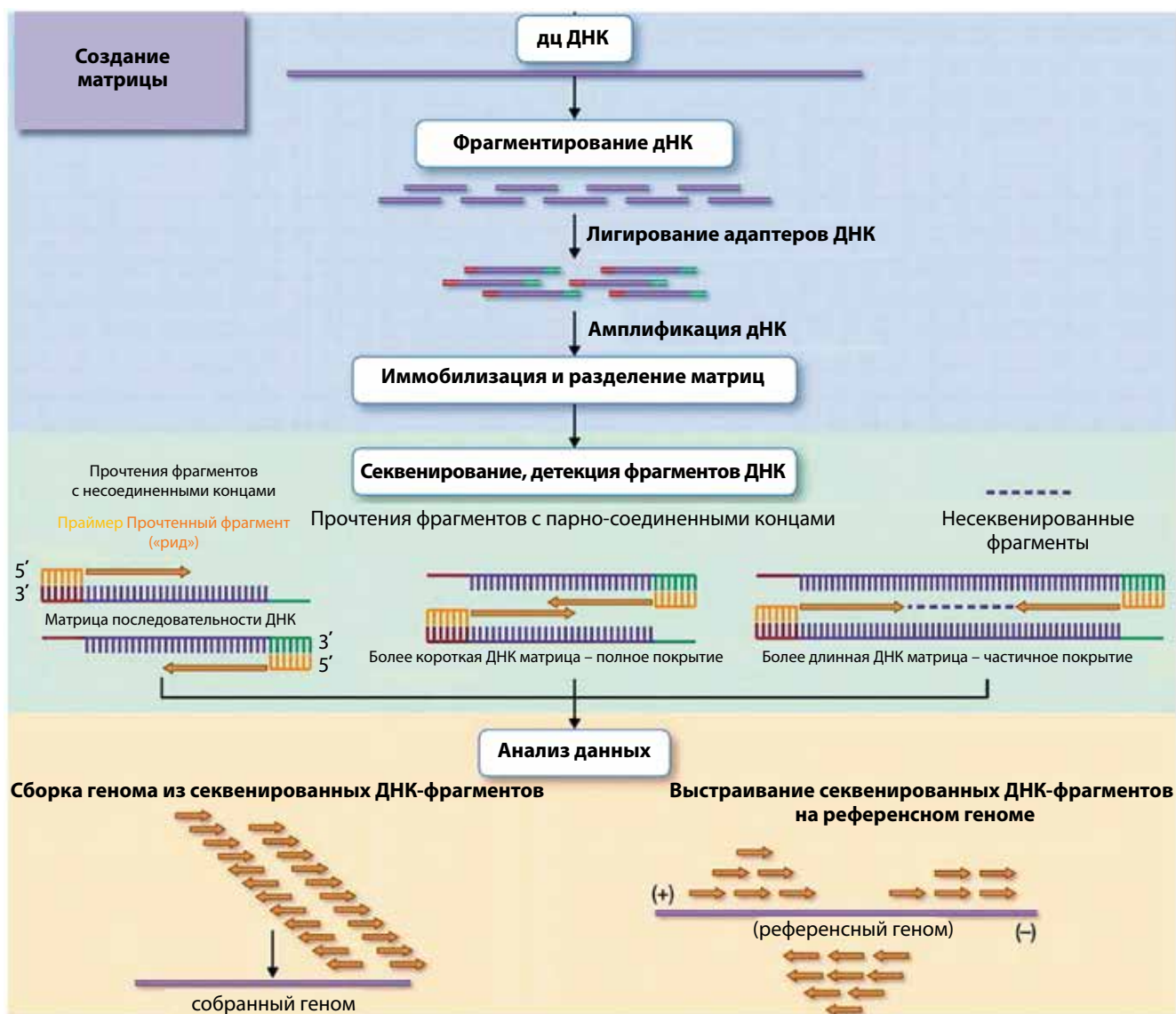
Секвенирование нового поколения

Мощным технологическим прорывом в генетике и в молекулярной медицине явилась разработка тех-

нологий NGS. Данный молекулярно-генетический метод основан на одновременном параллельном секвенировании миллионов коротких фрагментов ДНК с последующей биоинформатической «сборкой» и анализом полученных фрагментов генома с помощью специальных компьютерных программ (рис. 2). Сравнение результатов анализа с референсной (нормальной) последовательностью ДНК позволяет выявить различные типы мутаций в масштабах всего генома или его отдельных частей [29].

В настоящее время в клинической практике применяются 2 типа генетических исследований: таргетная (целенаправленная) генетическая диагностика и полногеномное, полноэкзомное секвенирование (см. таблицу). Таргетная диагностика — исследование на наличие конкретных генетических вариаций, ДНК-полиморфизмов или мутаций известной локализации. Полногеномное секвенирование дает возможность провести одновременный анализ всех известных генов в геноме человека [14, 29]. Данный метод может быть успешно использован для диагностики генетически обусловленных болезней/синдромов, особенно заболеваний с высокой генетической гетерогенностью, с неспецифичной клинической картиной (несиндромальных), а также для оценки вероятности развития заболевания вследствие мутации в нескольких генах (полигенные заболевания) или для высокоразрешающего (молекулярного) кариотипирования [29].

Широкое применение полногеномного секвенирования в генетической диагностике ограничено высокой стоимостью анализа и оборудования, сложностью биоинформатической обработки огромного массива получаемых данных. Однако стремительное развитие технологий секвенирования и биоинформатики, их удешевление привели к внедрению NGS в практическую



Референсная (условно нормальная) последовательность ДНК

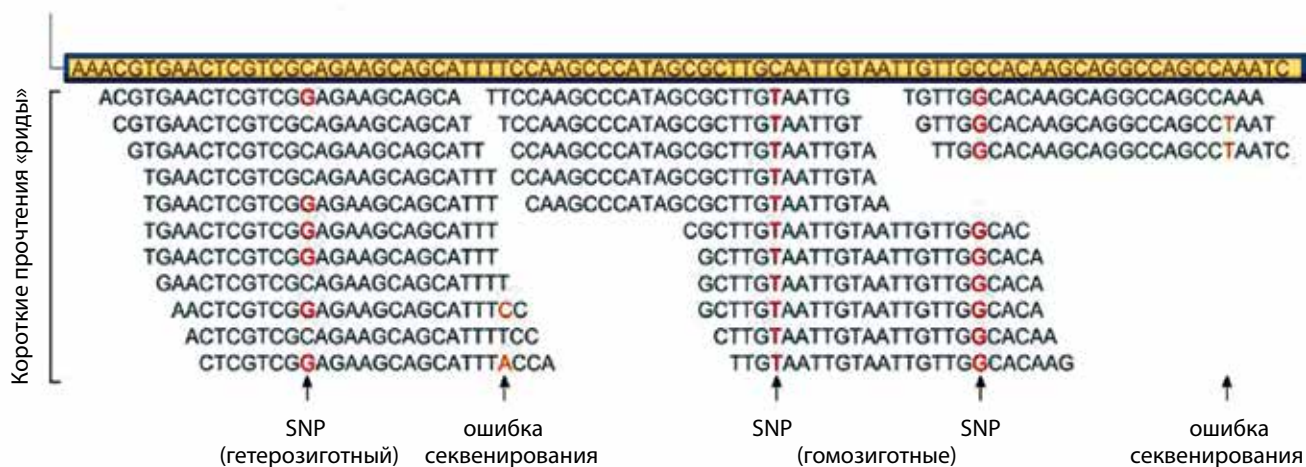


Рис. 2. Схематичное изображение технологии секвенирования ДНК нового поколения (NGS). дц ДНК – двухцепочечная ДНК; SNP – однонуклеотидный полиморфизм

медицину. Так, в 2009 г. новые технологии экзомного секвенирования стали использоваться для ДНК-диагностики редких наследственных заболеваний [30]. Данный подход позволяет определить последовательность кодирующих участков (экзонов) всех генов человека без определения некодирующих регионов (см. таблицу). Известно, что большинство генетических заболеваний связано с мутациями в последовательностях ДНК, кодирующих синтез белков, поэтому анализ экзома достаточен для определения подавляющего большинства патогенных мутаций [30].

Секвенирование экзома или всего генома позволяет производить поиск мутаций без подозрения на генетические изменения в каком-то конкретном гене (генах) или локусе. Поэтому оно наиболее оправдано в тех случаях, когда установление диагноза на основании только клинических признаков и данных негенетического лабораторно-инструментального обследования, результатов рутинных генетических исследований (стандартное кариотипирование, FISH-анализ, отдельные молекулярно-генетические анализы) проблематично или невозможно. Полногеномное исследование особенно актуально при редких или спорадических генетически обусловленных заболеваниях, синдромах и состояниях, в том числе связанных с нарушением репродукции, генетическая диагностика которых с помощью рутинных методов исследования крайне трудна или неэффективна [29].

Необходимо отметить, что на современном этапе развития технологий полногеномного анализа мутации, выявленные с помощью NGS, необходимо верифицировать другими, в том числе классическими, методами генетического исследования: секвенированием по Сэнгеру, полимеразной цепной реакцией или ее разновидностями, с FISH-анализом, мультиплексной лигационной цепной реакцией (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), ХМА или другими методами [14].

Исследование вариаций числа копий при нарушении репродуктивной функции

В последние годы начато активное исследование микроструктурных перестроек хромосом, CNV, в том числе при различных формах нарушения развития и функции органов мужской и женской репродуктивной системы, при бесплодии и невынашивании беременности, а также для детекции (скрининга) хромосомных мутаций у эмбриона до его имплантации и у плодов при потере беременности [16–28].

Среди известных CNV при мужском бесплодии впервые были описаны, в дальнейшем очень хорошо изучены и широко исследованы микроделеции длинного плеча хромосомы Y. В настоящее время исследование делеций в локусе AZF рутинно проводят многие генетические лаборатории для диагностики мужского бесплодия.

В данном участке Yq эухроматина (локусы Yq11.21–23) картированы 3 (суб) региона AZF: AZFa, AZFb и AZFc, полные делеции которых приводят к секреторной азооспермии и олигозооспермии тяжелой степени [2, 7, 10–12].

Ряд генов регионов AZFb и AZFc представлен на хромосоме Y в 2 или нескольких копиях (*BPY, CDY, DAZ, HSFY, PRY/VCY, RBMY, XKRY*). Потеря некоторых из этих копий может не оказывать столь выраженного негативного эффекта на сперматогенез, как при делециях, целиком удаляющих 1 регион, или более протяженных делециях локуса AZF. Наиболее часто микроделеции хромосомы Y располагаются в регионе AZFc (локус q11.23), одним из значимых генов данного региона, контролирующего сперматогенез, является ген *DAZ* (*Deleted in AZoospermia*) [7]. Число копий гена *DAZ* оказывает влияние на количественные (концентрацию и общее количество сперматозоидов) и качественные (количество подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов) показатели эякулята. В референсной хромосоме Y человека присутствуют 4 копии гена *DAZ* (*DAZ1/2* и *DAZ3/4*), имеющие более 99,9 % гомологии. Потеря всех копий *DAZ* приводит к секреторной азооспермии и олигозооспермии тяжелой степени вследствие выраженного угнетения сперматогенеза вплоть до синдрома «только клетки Сертоли» [7]. Мужчины с 0–2 копиями гена *DAZ* в геноме имеют значимо более низкую концентрацию сперматозоидов по сравнению с теми мужчинами, у которых 4 копии *DAZ* [27]. Не выявлено значимых различий между мужчинами с бесплодием и контрольной группой фертильных мужчин по частоте частичных дупликаций AZFc региона хромосомы Y (4,9 и 3,5 % соответственно). Однако для мужчин, имеющих большее число ($n = 6–8$) копий гена *DAZ*, характерна меньшая концентрация сперматозоидов по сравнению с контрольной группой [27].

Для различных AZF делеций, в частности AZFa, AZFb, AZFb+c, AZFc, выявлена определенная зависимость степени нарушения сперматогенеза и формы патозооспермии от типа делеции. Для большинства из них характерны секреторная азооспермия и криптозооспермия, но AZFc делеции оказывают разное влияние на сперматогенез и фертильность мужчин [7]. Частичные делеции AZFc региона имеют выраженную фенотипическую гетерогенность в отношении сперматогенеза и мужской фертильности, однако причина этого недостаточно изучена. Одним из генетических факторов этого может быть количество копий гена *TSPY1*, располагающегося в локусе Yp11.2 и кодирующего тестис-специфичный белок. Y. Shen и соавт. провели крупнокортное ($n = 2272$) исследование вариации числа копий *TSPY1* у мужчин с делециями AZFc региона для оценки возможного его влияния на сперматогенез [31]. Количество копий *TSPY1* определено у 704 мужчин с AZFc/“b2/b4” ($n = 216$) или “gr/gr”

делециями (с нормозооспермией, $n = 162$, с нарушениями сперматогенеза с делециями ‘gr/gr’, $n = 326$) и у 1568 мужчин без микроделений хромосомы Y (с нормозооспермией (контрольная группа), $n = 698$; с нарушениями сперматогенеза, $n = 870$). Выявлено значимое различие между мужчинами, не имевшими делеции AZFc региона, но страдавшими различными формами патозооспермии, по числу копий *TSPY1*. Нарушение сперматогенеза чаще отмечено у мужчин, имеющих менее 21 и более 55 копий гена *TSPY1*, по сравнению с мужчинами, имеющими 21–35 копий данного гена. Подобную зависимость наблюдали и у пациентов с делециями “gr/gr”. Полученные данные свидетельствуют, что число копий *TSPY1* влияет на возникновение нарушений сперматогенеза и их фенотипических проявлений при “gr/gr” делеции. Таким образом, данный тип CNV хромосомы Y является первым выявленным независимым генетическим фактором (фактором генетического фона), влияющим на сперматогенез и фенотипическое проявление делеций “gr/gr” у мужчин. Комбинированный анализ микроделений хромосомы Y и копийности гена *TSPY1* более информативен в оценке их значимости для нарушения сперматогенеза и может быть использован при медико-генетическом обследовании и консультировании мужчин с бесплодием [31].

После разработки и внедрения в практику методов сравнительной гибридизации начато их активное использование с целью поиска несбалансированных изменений генома, проведения анализа структурных перестроек хромосом, их точек разрыва, в том числе у пациентов с нарушениями репродуктивной системы. Так, F. Tüttelmann и соавт. впервые применили ХМА высокого разрешения для поиска CNV у пациентов с секреторной азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени неясного генеза [24]. Используя ХМА на чипах с 244 тыс. и 400 тыс. проб, они обследовали 126 мужчин с бесплодием, имеющих нормальный мужской (46,XY) кариотип (олигозооспермия тяжелой степени, $n = 89$; азооспермия и синдром «только клетки Сертоли», $n = 37$) и 100 мужчин контрольной группы (нормозооспермия) [24]. Обнаружено 3329 CNV, в том числе 1297 и 728 вариантов выявлены у пациентов с олигозооспермией и азооспермией соответственно и у 1304 вариантов — у мужчин контрольной группы. Использование чипов более высокого разрешения (400 т. п. н.) привело к двукратному увеличению числа обнаруженных CNV за счет выявления более мелких микроделений и микродупликаций. Среди всех обнаруженных вариантов большинство (81 %) являлись повторяющимися, а 19 % (529 аутосомных и 26 гоносомных) — неповторяющимися CNV. В данной работе не обнаружено значимых различий по количеству CNV у пациентов с бесплодием и фертильных мужчин, в том числе по числу крупных (>500 т. п. н.) вариантов.

Корреляция концентрации сперматозоидов с CNV в геноме не достигла уровня значимости, но была близкой к нему, зависимость количества подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов не выявлена [24]. Другие авторы показали, что у мужчин, имеющих CNV более 1, значимо ниже концентрация ($0,2 \pm 0,6$ против $1,0 \pm 2,0$ млн/мл) и общее количество сперматозоидов по сравнению с мужчинами, имеющими не более 1 CNV [25].

Детальный анализ локализации CNV не выявил специфичных «горячих» точек перестроек аутосом и хромосомы X, ассоциированных с синдромом «только клетки Сертоли» и олигозооспермией. Наибольший научный интерес представляют обнаруженные неоднократно пациент-специфичные CNV. Выявлены: 10 повторяющихся CNV — только среди пациентов с олигозооспермией тяжелой степени, 3 CNV — только при синдроме «только клетки Сертоли», 1 вариант CNV (в интроне гена *EPHA3*, располагающемся в локусе 3p11.1) в обеих группах с нарушением сперматогенеза, но не среди мужчин с нормозооспермией [24]. Важно отметить, что часть CNV захватывала гены (*PLEC*, *TSPAN7*, *PAK3*, *TRCP5* и *H2BFWT*), которые могут быть связаны с развитием синдрома «только клетки Сертоли» или вовлечены в этиологию 46,XY-дисгенезии гонад и синдрома преждевременной недостаточности яичника [24].

Хромосома X имеет существенное значение для развития репродуктивной системы и фертильности как у женщин, так и у мужчин, ее гены играют важную роль в генетическом контроле гаметогенеза. С помощью ХМА высокого разрешения (плотностью покрытия в среднем 4 т. п. н.) С. Krausz и соавт. выполнили молекулярно-цитогенетическое исследование хромосомы X у 96 пациентов с бесплодием, имеющих нарушение сперматогенеза неясного генеза (азооспермия, $n = 49$; криптозооспермия, $n = 25$; олигозооспермия, $n = 22$) и у 103 фертильных мужчин с нормозооспермией [25, 26]. Среди других задач в работе выяснялось, присутствует ли на хромосоме X аналог AZF-локуса, микроструктурные перестройки которого могли бы быть причиной бесплодия у мужчин. В результате выявлены 73 CNV (44 дупликации и 29 делеций), 55 из них являются вновь описанными микроструктурными вариантами хромосомы X, у 12 пациентов выявлены потенциально клинически значимые CNV [25]. Обнаруженные варианты имели размер от 1,4 т. п. н. до 1609 т. п. н., при этом крупные перестройки (>300 т. п. н.) были представлены дупликациями и только 17 % микроделений являлись относительно крупными. Примечательно, что в некоторых областях (Xp11.12-q21.1) обнаружены только дупликации, в других (Xq27.1-q27.3) — только делеции. Выявлены значимые различия как по количеству микроделений хромосомы X на 1 обследуемого в группе мужчин с бесплодием

по сравнению с контрольной группой (0,57 против 0,21 соответственно; $p = 8,785 \times 10^{-6}$), так и по среднему размеру микроделений хромосомы X на 1 обследуемого (11,79 т. п. н. и 8,13 т. п. н. соответственно; $p = 3,435 \times 10^{-4}$) [25]. Поскольку 68 % CNV, выявленных в контрольной группе, являлись дупликациями, очевидно, что большинство из них не являются причиной мужского бесплодия. В контрольной группе микроделеции составили только 38 % обнаруженных CNV, что указывает на их возможную вовлеченность в нарушение сперматогенеза.

Наибольшая плотность CNV отмечена в псевдоаутосомном регионе *PAR1* (*Pseudoautosomal Region 1*), аналог локуса *AZF* на хромосоме X не обнаружен [25]. Одна из микроделений — CNV15 (в локусе Xp22.33/регион *PAR1*), имеющая размер 17,3 т. п. н., обнаружена у 24 % мужчин с бесплодием и только у 1 % мужчин из контрольной группы. Локусы с высокой гомологией выявлены только у 19 % обнаруженных вариантов [25]. Это свидетельствует о том, что механизм большинства обнаруженных CNV не связан с неаллель-гомологичной (*NAHR*) рекомбинацией. Многие из выявленных перестроек затрагивали локусы хромосомы X, содержащие представители семейства генов, кодирующих антигены при раке яичка СТА (*Cancer Testis Antigens*). Так, CNV67, приводили к делеции гена *MAGEA9B*, имеющего тестис-специфическую экспрессию с наивысшим уровнем в сперматоцитах, а также в некоторых опухолях [25]. Кроме того, определены и другие гены, функция которых может быть нарушена при изменении числа копий на хромосоме X и которые связаны с регуляцией сперматогенеза: *MAGEC1*, *MAGEC3*, *TMEM185A*, *CXorf40A*, *HSFX1*, *HSFX2*, *SPACA5*, *SPANXE*, *VCX3A* и др. [25]. Так, у пациентов с делецией генов *HSFX* отмечено выраженное угнетение сперматогенеза, вплоть до синдрома «только клетки Сертоли».

В дальнейшем исследована клиническая значимость 5 отобранных CNV (*DUP1A*, *DUP5*, *DUP20*, *DUP26* и *DUP40*) хромосомы X, специфичных для мужского бесплодия [26]. Анализ данных микродупликаций выполнен на более крупной выборке (276 мужчин с бесплодием и 327 человек контрольной группы), для *DUP1A* дополнительно обследовано 338 индивидуумов. Все CNV подтверждены как пациент-специфичные и имели статически значимое различие между обследованными группами ($p = 1,65 \times 10^{-4}$). Дупликации *DUP20* и *DUP26* представляли собой уникальные варианты, выявленные только у 2 мужчин с бесплодием, 3 CNV (*DUP1A*, *DUP5* и *DUP40*) выявлены неоднократно среди пациентов и не обнаружены в контрольной группе. Суммарная частота 5 исследованных CNV у мужчин с бесплодием составила 3,9 %. Дупликации включали в себя гены или располагались в непосредственной близости к генам, имеющим тестис-специфичную экспрессию. Вариант *DUP1A*, имеющий размер 245–247 т. п. н.

и локализованный в дистальном участке псевдоаутосомного региона *PAR1*, обнаружен у 1,4 % мужчин с бесплодием и не выявлен в контрольной группе из 507 человек [26]. У всех мужчин с данным вариантом диагностирована секреторная азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени. По-видимому, механизм негативного влияния на сперматогенез *DUP1A* связан с повышенной экспрессией гена *PPP2R3B*, входящего в область данной дупликации, и с изменением активности его антагониста — РНК *LINC00685* (кодируемой участком, прилегающим к *DUP1A*), которые вовлечены в контроль вхождения в митоз сперматогониев и прогрессию мейоза в сперматоцитах [26].

Наличие структурных перестроек хромосом может влиять на процесс деления половых клеток на уровне конъюгации и рекомбинации гомологичных хромосом в ходе мейоза. Однако в целом не подтверждено предположение о том, что у мужчин с бесплодием повышено общее количество CNV в геноме по сравнению с фертильными индивидуумами [24]. По-видимому, большинство микроструктурных вариантов, не затрагивающих гены, влияющие на дифференцировку, деление и созревание половых клеток, не приводят к нарушению мейоза и сперматогенеза. Плотность расположения CNV в области нормальной X-Y рекомбинации — регионе *PAR1*, в частности варианты *DUP1A* и *DUP5*, свидетельствует, что одним из механизмов их патогенного действия может являться нарушение конъюгации и рекомбинации половых хромосом в процессе мейоза [26]. Следует отметить, что из-за 99,99 % идентичности псевдоаутосомных областей для CNV, располагающихся в них, не представляется возможным точно установить их локализацию (на хромосоме X или Y) по данным ХМА.

Недавнее исследование CNV у мужчин с бесплодием и нарушением сперматогенеза вследствие блока профазы I мейоза, позволило выявить 2 аутосомных CNV, кандидатных для азооспермии и олигозооспермии [21]. Один из них представлял собой дупликацию на хромосоме 3 (chr3: 39564967–39951358) размером 386 т. п. н., обнаруженную в гетерозиготном состоянии. Данная область хромосомы 3 содержит гены *MYRIP*, *RAB* и миозина VIIA. Кодированный геном *MYRIP* белок экспрессируется в яичках, локализуясь в цитоплазме (в комплексе Гольджи) сперматозоидов на стадии пахитены профазы I мейоза, и необходим для созревания сперматид [21]. Другой CNV, также выявленный в гетерозиготном состоянии, представлял собой дупликацию размером 3,94 млн п. н. на хромосоме 11 (chr11: 38997328–42944666). Данная область охватывает последовательности генов *LOC100507205* и *LRRC4C* (лиганд Netrin-G — 1). Продукт первого — не охарактеризованная в базах данных некодирующая РНК. Ее транскрипт — некодирующие РНК длиной 479 пар оснований не содержит открытую рамку считывания

и экспрессируется в яичках взрослого человека. Ген *LRRC4C* высокоактивен в головном мозге, где кодируемый им белок играет ведущую роль в регулировании роста и миграции аксонов в нейронах таламокортикальной области, а также экспрессируется в яичках. Белок LRRC4C локализуется к цитоплазме клеток Сертоли, сперматоцитах на стадии пахитены (сконцентрирован на плазматической мембране), а также в округлых сперматидях. В данной работе также выполнен поиск CNV в определенных регионах с анализом SNP у 110 мужчин с идиопатической азооспермией и у 97 фертильных мужчин [21]. Обнаружены CNV, содержащие *HSP2A*, у 3 мужчин с азооспермией, у 2 из них выявлена дупликация, у 1 — делеция в гетерозиготном состоянии. Гетерозиготная делеция *LRRC4C* также обнаружена у 1 пациента. Эти CNV не выявлены в контрольной группе, поэтому могут представлять собой патогенные варианты, связанные с мужским бесплодием. Несмотря на то, что полученные результаты свидетельствуют об их редкой встречаемости данных вариантов копий у мужчин с азооспермией (*HSP2A* и делеция *LRRC4C* — 0,9 %, дупликация *HSP2A* — 1,82 %). Более точно их частоты могут быть определены при обследовании больших выборок. Следует отметить, что некоторые CNV обнаружены и в группе фертильных мужчин, включая гетерозиготную делецию *MYRIP* и гетерозиготную делецию *PMS2* соответственно. Поэтому уменьшение дозы генов *MYRIP* или *PMS2* может не быть патогенным в отношении нарушения фертильности у мужчин [21].

Другое исследование связи нарушения сперматогенеза с изменением CNV в геноме выполнено у мужчин с хромосомными аномалиями и секреторной азооспермией неясного генеза [28]. У 11 из 13 пациентов с хромосомными аномалиями обнаружены 16 CNV, 26 CNV найдены у 16 из 20 (80 %) мужчин с азооспермией [28]. Выявленные варианты числа копий имели следующую локализацию: у 3 пациентов обнаружены в локусах 11p11.12 и 14q11.2, у 2 человек — в локусах 6p21.32, 13q11, 15q11.11, 16p12.2 и 21q22.3. Найденные регионы включали следующие гены: *EDDM3A*, *EDDM3B*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *POTEB*, *GOLGA8C*, *DNMT3L*, *ALF*, *NPHP1*, *NRG1*, *RID2*, *ADAMTS20*, *TWF1*, *COX10*, *MAKA* и *DNEL1* [28]. Поскольку некоторые CNV могут влиять на экспрессию генов в яичках и приводить к нарушению сперматогенеза, участки варибельной копияности, в том числе с вовлечением генов, связанных с мужским бесплодием, определены как на половых хромосомах, так и на различных аутосомах человека.

Фертильность в значительной мере связана не только с количеством и качеством созревших гамет, но и с частотой и спектром хромосомных мутаций у эмбриона. Большинство беременностей самопроизвольно прерывается из-за хромосомных аномалий у эмбриона/плода. В последние годы с помощью микроматричного

анализа хромосом выполнен ряд исследований CNV у плодов при невынашивании беременности [18, 19]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что относительно нечасто встречаются (1,6 %) клинически значимые CNV варианты у эуплоидных эмбрионов. Частота редких вариантов, для которых неизвестна их клиническая значимость (VUS, variant of unknown significance), значительно варьировала (1–40 %), в среднем составляя около 3 %. Влияние изменения числа копий при невынашивании беременности представляется сложным и малоизученным. Большинство (около 90 %) обнаруженных изменений числа копий являются распространенными вариантами и часто затрагивают гены, связанные с иммунным ответом и с процессами, необходимыми для репродукции, например гены, кодирующие антигены комплекса гистосовместимости (человеческий лейкоцитарный антиген, Human Leucocyte Antigen, HLA) I и II классов, *RNASE3*, *CAV1*, *H2B-FM*, *H2BFWT* и другие гены [18, 19]. Примечательно, что плотность генов и число известных для них патогенных фенотипов значимо (более чем в 2 раза) выше для редких CNV, чем для распространенных вариантов числа копий, однако их клиническая значимость в отношении невынашивания неизвестна [19].

Использование GWAS в поиске генов, связанных с нарушением фертильности у мужчин

Генетические факторы нарушения репродукции чрезвычайно разнообразны, в геноме человека присутствует множество локусов, изменения в которых могут приводить к бесплодию. Следовательно, анализ отдельных генов или участков хромосом позволяет выявить только наиболее частые мутации. Однако значительная часть генетического разнообразия обусловлена не хромосомными и генными мутациями, микроструктурными перестройками и CNV, а различными ДНК-полиморфизмами, в первую очередь с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP). Их общее количество в геноме человека составляет более 3 млн (т. е. около 1 % генома), в среднем 1 SNP встречается примерно на каждые 300–400 нуклеотидов. Исследование всего генома по множеству различных генетических вариантов локусов/генов, которые могут быть связаны (ассоциированы) с развитием какого-либо изменения фенотипа, заболевания, — широкогеномное исследование (гено-фенотипических) ассоциаций (Genome Wide Associations Study, GWAS). Использование данного подхода в определении генотипа и его сравнительном анализе с нормальным (референсным) в масштабе всего генома с помощью молекулярно-генетического исследования множества аллелей позволяет проводить поиск генов-кандидатов, предположительно ответственных за развитие каких-либо моногенных и полигенных заболеваний или патологических признаков (рис. 3, см. таблицу). Опубликованы результаты подобных исследований, нацеленных

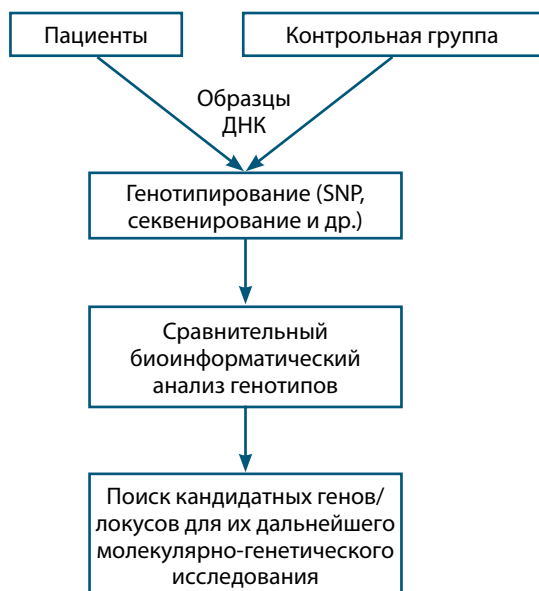


Рис. 3. Схема проведения широкогеномного исследования гено-фенотипических ассоциаций (GWAS).

на поиск новых генов и локусов, вовлеченных в этиологию нарушений репродуктивной системы, в том числе нескольких, связанных с бесплодием у мужчин [32–35].

Впервые широкогеномный поиск SNP-полиморфизмов, связанных с мужским бесплодием, был предпринят в 2009 году [32]. Обследовано 92 пациента с патозооспермией (секреторная азооспермия, $n = 40$; олигоастенотератозооспермия, $n = 52$) и 80 мужчин с нормозооспермией. При анализе 370 тысяч ДНК-полиморфизмов отобран 21 SNP-вариант, значимо ($p < 0,0001$) ассоциированный с азооспермией и олигозооспермией [32]. Затем на более крупной выборке, состоящей из 284 мужчин с бесплодием (секреторная азооспермия, $n = 80$; олигозооспермия тяжелой степени, $n = 141$, умеренной степени, $n = 63$) и 158 мужчин с нормозооспермией (контрольная группа). Из 172 проанализированных однонуклеотидных вариантов выявлено только 4 SNP, значимо ассоциированных с бесплодием у мужчин различного этнического происхождения [33].

Выявлена наиболее выраженная ассоциация олигозооспермии с SNP-вариантом rs5911500, располагающимся примерно в 200 т. п. н. от X-сцепленного гена *SLC6A14* хромосомы X. Еще 3 SNP (rs2059807, rs11204546 и rs10246939) располагаются в аутосомных генах, кодирующих рецепторы, значимо ассоциированы с азооспермией и олигозооспермией. Вариант rs2059807, ассоциированный с олигозооспермией, располагается в интронной области гена инсулинового рецептора *INSR*. Его не синонимичный вариант rs11204546, ассоциированный с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени, располагается в гене обонятельного рецептора *OR2W3*, другой не синонимичный вариант rs10246939, ассоциированный с азооспермией, располагается в гене вкусового рецептора *TAS2R38* [33].

Выявлены и другие SNP-варианты, значимо ассоциированные с нарушением сперматогенеза, локализованные в генах с тестис-специфичной экспрессией: *TEX15*, *FASLG*, *BRDT* и *JMJD1A*. У мышей с нокаутированным геном *Tex15* отмечен блок в профазе сперматогенеза. Кодированный им белок, вероятно, вовлечен в процессы репарации двухцепочечных разрывов ДНК и синапсиса гомологичных хромосом в мейозе [34]. Вариант rs763110 располагается в промоторной области гена *FASLG*, вовлеченного в контроль апоптоза половых клеток и ассоциированного с предрасположенностью к развитию злокачественных опухолей [35].

Недавно выполнен поиск с помощью GWAS генов, вовлеченных в нарушение сперматогенеза и фертильности, у мужчин азиатских популяций (олигозооспермия, $n = 784$; фертильные мужчины, $n = 592$). Так, М. Ху и соавт. обнаружили 2 варианта (rs3197744 в гене *SIRPA* и rs11046992 в гене *SOX5*), которые статистически значимо ($p = 0,005$) ассоциированы с олигозооспермией у мужчин из популяции Китая [36]. При сравнении обследованных мужчин с бесплодием ($n = 126$) и фертильных ($n = 791$) мужчин из японской и североамериканской популяций установлено, что варианты rs7867029, rs7174015 и rs12870438 значимо связаны с нарушением сперматогенеза и фертильности у мужчин [37]. Варианты rs7867029 и rs7174015 ассоциированы с олигозооспермией, rs12870438 — с азооспермией, при этом варианты rs7174015 и rs12870438 располагаются в интронных областях генов *USP8* и *EPSTI*, которые характеризуются высоким уровнем экспрессии в яичках [37].

Согласно результатам исследований множества ДНК-полиморфизмов в геноме человека, очевидно, что этиология большинства «сложных» заболеваний полигенна, при этом не обнаружены какие-либо отдельные SNP варианты, которые бы обуславливали значимое количество случаев мужского бесплодия.

Исследование митохондриальной ДНК при нарушении фертильности у мужчин

Генетическими факторами нарушения фертильности у мужчин являются изменения не только ядерного, но и митохондриального генома. Влияние митохондриальной ДНК (мтДНК) на сперматогенез, наличие повышенного количества ее делеций и генных мутаций в сперматозоидах при олигозооспермии и астено-/тератозооспермии показано многими исследователями [38]. Недавно опубликованы результаты анализа мтДНК с помощью метода NGS у мужчин с бесплодием и фертильных мужчин. Так, Lu с коллегами обследовали 921 пациента с идиопатической олигоастенотератозооспермией и 766 здоровых мужчин, составивших контрольную группу [39]. Обнаружено 7 однонуклеотидных полиморфизмов (C5601T, T12338C, A12361G, G13928C, A15235G, C16179T и G16291A), которые могут быть связаны с идиопатической олигоастенотератозооспермией.



Все варианты мтДНК верифицированы с помощью SNP микрочипов. Полученные данные свидетельствуют о связи вариантов C16179T и A12361G с идиопатическим мужским бесплодием. Показано, что вариант C16179T значимо ассоциирован с олигозооспермией и астенозооспермией, а вариант A12361G — с олигозооспермией [39]. Результаты исследования мтДНК у мужчин позволяют предполагать, что ее определенные изменения (делеции и некоторые полиморфизмы) в сочетании с увеличенным количеством SNP в ядерных генах могут ухудшать работу дыхательных цепей митохондрий и уменьшать количество аденозинтрифосфата, продуцируемого в мужских половых клетках, что нарушает нормальную дифференцировку митохондрий, приводя к нарушениям спермато- и/или спермиогенеза. Данные сведения полезны для понимания регуляции сперматогенеза, причин и механизмов нарушения фертильности и бесплодия у мужчин, однако необходимо провести дополнительные исследования для подтверждения полученных результатов.

Новые молекулярно-генетические технологии в диагностике нарушений формирования пола, полового развития и репродукции

Наиболее эффективно новые методы анализа генома могут быть использованы в исследовании причин и в диагностике моногенных и гетерогенных генных заболеваний, микроделеционных и микродупликационных синдромов, в том числе с поражением развития или функции репродуктивной системы [20, 40, 41].

Этиология большинства случаев нарушения формирования пола (НФП) связана с патогенными изменениями генома, с аномалиями половых хромосом или микроструктурными и генными мутациями, затрагивающими локусы/гены, вовлеченные в дифференцировку и развитие органов половой системы. Наибольшее количество аномалий пола отмечено при нарушении полового развития с нормальным мужским кариотипом — 46,XY НФП. Молекулярный анализ гена *SRY* (Sex-determining Region Y) позволяет выявить его делеции и мутации у 10–15 % пациентов с XY-дисгенезией гонад, наличие этого гена у 85–90 % пациентов с 46,XX-тестикулярной формой НФП (синдромом де ля Шаппеля / 46,XX-мужчина). Еще в 10–15 % случаев НФП, не связанных с цитогенетическими аномалиями половых хромосом, причину заболевания возможно установить с помощью молекулярного анализа «частых» генов (например, *SOX9*, *DAX1/NROB1*, *AR/HUMARA*), вовлеченных в половую дифференцировку у человека [41]. Однако в большинстве (65–70 %) случаев НФП, не связанных с аномалиями кариотипа, рутинное генетическое обследование оказывается неэффективным. Использование новых молекулярных технологий позволяет повысить эффективность генетической диагностики НФП на 25–30 %, то есть в 2 раза и более [41].

Перспективным подходом к обнаружению мутаций является выполнение ХМА в качестве анализа первой линии. Если не удастся обнаружить патогенные мутации при ХМА, показано выполнение 2-го этапа — полноэкзомного секвенирования, в случае невыявления мутаций после второго этапа предстоит решить вопрос о проведении полноэкзомного секвенирования [41]. Однако следует отметить, что данный подход представляется приемлемым не для всех пациентов с нарушением пола, а для больных с определенными формами НФП. Не следует пренебрегать стандартными методами цитогенетической диагностики, FISH-анализом и анализом отдельных генов, особенно в случаях гоносомных синдромов и нарушений формирования пола, в генетической структуре которых имеются частые мутации и/или их дифференциальная диагностика не представляет больших трудностей (например, синдром тестикулярной феминизации, дефицит 21-гидроксилазы).

Новые методы молекулярной диагностики могут быть использованы и для выявления генетических причин полового созревания, в частности гипогонадотропного гипогонадизма и синдрома Кальмана. Недавно с помощью NGS проанализирован 261 ген, вовлеченный в гипоталамический, гипофизарный и/или обонятельный пути. Отобранные варианты подвергнуты классическому секвенированию по Сэнгеру [42]. Идентифицированы 2 новые мутации гена *FGFR1*, выделены 18 новых генов-кандидатов, ответственных за развитие гипогонадотропного гипогонадизма и синдрома Кальмана: *AMN1*, *CCKBR*, *CRY1*, *CXCR4*, *FGF13*, *GAP43*, *GLI3*, *JAG1*, *NOS1*, *MASTL*, *NOTCH1*, *NRP2*, *PALM2*, *PDE3A*, *PLEKHA5*, *RD3*, *TRAPPC9* и *TSPAN11*. Выявлены варианты последовательности ДНК, классифицированные как вероятно патогенные (сдвиг рамки считывания, нонсенс-мутации) или патогенные (миссенс-мутации). Наличие 2 и 3 мутаций обнаружено у 8/48 (16,7 %) и у 1/48 (2,1 %) пациентов соответственно [42].

Комбинирование NGS и ХМА позволяет значительно повысить эффективность генетической диагностики патологии сперматогенеза и синдромальной патозооспермии. Так, таргетный анализ 32 генов, связанных с развитием первичной цилиарной дискинезии (ПЦД), позволяет установить причину данного высокогетерогенного аутосомно-рецессивного заболевания у 65–76 % больных с ПЦД [43]. Основным методом диагностики ПЦД является электронная микроскопия, которая позволяет выявить различные типы ультраструктурных нарушений — цилиопатии (дефекты строения жгутиков сперматозоидов и ресничек клеток). Молекулярный анализ генов, связанных с развитием ПЦД, редко выполняют из-за выраженной генетической гетерогенности патологии, высокой стоимости и низкой эффективности исследования отдельных генов. В качестве генетического исследования первой

линии предложено проводить полноэкзомное секвенирование с последующим биоинформатическим анализом панели генов, связанных с ПЦД, затем при необходимости выполнять анализ CNV с помощью ХМА или мультиплексной лигазной цепной реакции [43].

Многочисленность факторов, влияющих на фертильность и репродукцию человека, их значительная гетерогенность и множественность возможных их комбинаций, комплексность различных изменений и вариаций генома, фенотипическая вариабельность существенно затрудняют клиническую интерпретацию результатов исследования. Наиболее адекватным в диагностике нарушений репродукции является междисциплинарный подход с проведением не только комплексного обследования, но и системного (в том числе с помощью компьютерных экспертных систем) анализа данных, полученных о пациенте, его заболевании, состоянии здоровья, генотипе и т. д. Без этого невозможна современная персонализированная медицина.

Заключение

Сегодня в арсенале специалистов в области медицинской генетики и репродуктивной медицины имеется множество разных, в том числе высокотехнологичных, методов исследования. Однако до недавнего времени дорогостоящие молекулярные методы анализа генома использовали преимущественно в целях научного исследования, а не диагностики. Вследствие высокой гетерогенности и многофакторности нарушений репродукции, связанных с генетическими причинами/факторами, тестирование отдельных генов или их групп неэффек-

тивно. Наиболее перспективным является широкогеномное или полногеномное исследование. Однако не следует считать, что новые молекулярные методы исследования целиком заменят или вытеснят классические лабораторные методы медико-генетического обследования (стандартное цитогенетическое исследование, FISH, полимеразная цепная реакция и др.), многие из которых стали стандартными и широко используются в генетике, молекулярной биологии и медицине. Новые молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические технологии значительно расширяют возможности диагностики аномалий формирования пола и полового развития, бесплодия, невынашивания беременности, а также предимплантационной генетической диагностики. Умелое комбинирование различных генетических методов представляется оптимальным подходом в обследовании пациентов с нарушением репродукции. Наиболее перспективным является использование указанных методов у пациентов с тяжелыми формами бесплодия, особенно в конкретных клинических группах, таких как синдромальная патология сперматогенеза (цилиарная дискинезия, синдром «только клетки Сертоли» и др.), НФП и полового развития, не связанные с аномалиями гоносом, например гипогонадотропный гипогонадизм или синдром Кальмана. Полногеномное исследование может быть рекомендовано мужчинам с бесплодием неясного генеза после стандартного цитогенетического исследования и анализа на частые мутации (стандартное кариотипирование, анализ микроделеций хромосомы Y и частых мутаций гена муковисцидоза).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Глинкина Ж.И., Леонов Б.В., Бахарев В.А., Лукин В.А. ПГД врожденных и наследственных заболеваний методом FISH в программе ЭКО и ПЭ. В кн.: Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова, Л.Н. Кузьмичева. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 162–197. [Glinkina Zh.I., Leonov B.V., Bakharev V.A., Lukin V.A. PGD of congenital and hereditary disorders using FISH in the IVF and ET program. In: Treatment of male and female infertility. Assisted reproductive technologies. Eds. V. I. Kulakov, B.V. Leonov, L.N. Kuzmichev. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2005. P. 162–197. (In Russ.)].
2. Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction. Eds by: E. Nieschlag, H.M. Behre, S. Nieschlag. 3rd ed. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2010. 629 p.
3. Matzuk M.M., Lamb D.J. The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. Nat Med 2008;14:1197–213.
4. Курило Л.Ф., Андреева М.В., Коломиец О.Л. и др. Генетические синдромы с нарушениями развития органов половой системы. Андрология и генитальная хирургия 2013; (4):17–27. [Kurilo L.F., Andreeva M.V., Kolomiets O.L. et al. Genetically caused congenital anomalies of reproductive system. Andrologiya i genitalnaya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2013; (4):17–27. (In Russ.)].
5. Курило Л.Ф. Аномалии развития половой системы вследствие генных мутаций (Обзор литературы). Клиническая и экспериментальная морфология 2014; (2):58–65. [Kurilo L.F. Developmental anomalies of the reproductive system caused by gene mutations (literature review). Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Journal of Clinical and Experimental Morphology 2014;(2): 58–65. (In Russ.)].
6. Курило Л.Ф. Хромосомные заболевания органов половой системы. Клиническая и экспериментальная морфология 2015; (1):48–59. [Kurilo L.F. Chromosomal diseases of the reproductive organs. Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Journal of Clinical and Experimental Morphology 2015;(1):48–59. (In Russ.)].
7. Черных В.Б. Генетические факторы мужского бесплодия. Материалы. Всероссий. науч.-практ. конф. «Молекуляр-

- ные методы диагностики моногенных заболеваний: возможности и перспективы». Медицинская генетика 2006;2 (прилож.): 8–14. [Chernykh V.B. Genetic factors of male infertility. Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference “Molecular methods of diagnosis of monogenic disorders: Capabilities and possibilities.” Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2006;2 (appendix):8–14. (In Russ.)].
8. De Braekeleer M., Dao T.N. Cytogenetic studies in male infertility: a review. Hum. Reprod 1991;6(2):245–50.
9. Van Assche E., Bonduelle M., Tournaye H. et al. Cytogenetics of infertile men. Hum Reprod 1996;11(Suppl 1) 4:1–24.
10. Gardner R.J.M., Sutherland G.R., Shaffer L.G. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2012. 634 p.
11. McLachlan R.I., O’Bryan M.K. State of the art for genetic testing of infertile men. J Clin Endocrinol Metab 2010;95(3):1013–24.
12. Krausz C., Escamilla A.R., Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. Reproduction 2015;150(5):159–74.
13. Carrell D.T., Aston K.I., Oliva R. et al. The “omics” of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. Cell Tissue Res 2016;363(1):295–312.
14. Суспицын Е.Н., Соколенко А.П. Применение молекулярных технологий нового поколения в медицинской генетике: Научно-образовательный курс для студентов медицинских вузов и врачей. СПб., 2013. 22 с. [Suspitsyn E.N., Sokolenko A.P. Use of next-generation molecular technologies in medical genetics: Educational course for medical universities and doctors. Saint-Petersburg, 2013. 22 p. (In Russ.)].
15. Абилов С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии: Учеб. пос. М.; СПб.: Нестор-История, 2015. 304 с. [Abilev S.K., Glazer V.M. Mutagenesis with the basics of genotoxicology: Textbook. Moscow; Saint-Petersburg: Nestor-Istoriya, 2015. 304 p. (In Russ.)].
16. Ledig S., Röpke A., Wieacker P. Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. Sex Dev 2010;4(4–5):225–32.
17. Rajcan-Separovic E. Chromosome microarrays in human reproduction. Hum Reprod Update 2012;18(5):555–67.
18. Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W.P. et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. Hum Reprod 2010;25(11):2913–22.
19. Bagheri H., Mercier E., Qiao Y. et al. Genomic characteristics of miscarriage copy number variants. Mol Hum Reprod 2015;21(8):655–61.
20. Barseghyan H., Délot E., Vilain E. New genomic technologies: an aid for diagnosis of disorders of sex development. Horm Metab Res 2015;47(5):312–20.
21. Eggers S., DeBoer K.D., van den Bergen J. et al. Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility. Fert Steril 2015;103(1):214–9.
22. Lee C.H., Wu C.C., Wu Y.N., Chiang H.S. Gene copy number variations in Asian patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. Hum Reprod 2009;24(3):748–55.
23. Krausz C., Chianese C., Giachini C. et al. The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility. J Endocrinol Invest 2011;34(5):376–82.
24. Tütelmann F., Simoni M., Kliesch S. et al. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. PLoS One 2011;6(4):e19426.
25. Krausz C., Giachini C., Lo Giacco D. et al. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. PLoS One 2012;7(10):e44887.
26. Chianese C., Gunning A.C., Giachini C. 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;9(6):e97746.
27. Lo Giacco D., Chianese C., Sánchez-Curbelo J. et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. Europ J Hum Genet 2014;22(6):754–61.
28. Dong Y., Pan Y., Wang R. et al. Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. Genet Mol Res 2015;14(4):16041–9.
29. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. Под общ. ред. Д.В. Ребрикова. 2-е изд. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2015. 232 с. [Rebrikov D.V., Korostin D.O., Shubina E.S., Ilyinskiy V.V. NGS: High-performance sequencing. Ed. D.V. Rebrikov. 2nd edition. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy, 2015. 232 p. (In Russ.)].
30. Worthey E.A. Analysis and annotation of whole-genome or whole-exome sequencing-derived variants for clinical diagnosis. Curr Protoc Hum Genet 2013;79:Unit 9.24.
31. Shen Y., Yan Y., Liu Y. et al. A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the gr/gr deletion. Hum Mol Genet 2013;22(8):1679–95.
32. Aston K.I., Carrell D.T. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. J Androl 2009;30(6):711–25.
33. Aston K.I., Krausz C., Laface I. et al. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. Hum Reprod 2010;25(6):1383–97.
34. Yang F., Eckardt S., Leu N.A. et al. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. J Cell Biol 2008;180(4):673–9.
35. Wang W., Lu N., Xia Y. et al. FAS and FASLG polymorphisms and susceptibility to idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. Reprod Biomed Online 2009;18(1):141–7.
36. Xu M., Qin Y., Qu J. et al. Evaluation of five candidate genes from GWAS for association with oligozoospermia in a Han Chinese population. PLoS One 2013;8(11):e80374.
37. Sato Y., Tajima A., Tsunematsu K. et al. An association study of four candidate loci for human male fertility traits with male infertility. Hum Reprod 2015;30(6):1510–4.
38. Хаят С.Ш. Ультраструктурные и генетические основы двигательной активности жгутика сперматозоида. Андрология и генитальная хирургия 2012; (1):59–61. [Khayat S.Sh. Ultrastructural and genetic basics of spermatozoon flagellum mobility. Andrologiya i genitalnaya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2012; (1):59–61. (In Russ.)].
39. Lu C., Xu M., Wang R. et al. A genome-wide association study of mitochondrial DNA in Chinese men identifies two risk single nucleotide substitutions for idiopathic oligoasthenospermia. Mitochondrion 2015;24:87–92.
40. Arboleda V.A., Lee H., Sanchez F.J. et al. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. Clin Genet 2013;83(1):35–43.
41. Baxter R.M., Arboleda V.A., Lee H. et al. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. J Clin Endocrinol Metab 2015;100(2):E333–44.
42. 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;437:86–96.
43. Marshall C.R., Scherer S.W., Zariwala M.A. et al. Whole-Exome Sequencing and Targeted Copy Number Analysis in Primary Ciliary Dyskinesia. G3 (Bethesda) 2015;5(8):1775–81.