

В. С. БАРАНОВ, Т. В. КУЗНЕЦОВА

ЦИТОГЕНЕТИКА

ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА



Санкт-Петербург
Издательство Н-Л
2007

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

Рецензенты:

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

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

Все права защищены ©

С.5-24 Баранов В.С., Кузнецова Т. В.

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

ISBN 5-94869-034-2

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

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

ББК 28.704
УДК 612.646–075.6:575

© Баранов В.С., Кузнецова Т.В.; 2007

© Издательство Н-Л; 2007

© Дизайн обложки Бурова М.В.

ISBN 5-94869-034-2

СОДЕРЖАНИЕ

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

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

ГЛАВА 4

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

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

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

ГЛАВА 5

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

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

ГЛАВА 6

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

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

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

ГЛАВА 7

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

ГЛАВА 8

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

ГЛАВА 9

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

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

ГЛАВА 10

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Введение	375
----------------	-----

10.1. Особенности структурной организации ядрышкообразующих районов хромосом человека

10.1.1. Полиморфизм ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом	377
---	-----

10.1.2. Механизмы регуляции функциональной активности рибосомных генов	379
---	-----

10.1.3. Характеристика функционального состояния ЯОР в эмбриогенезе человека	382
---	-----

10.1.3.1. Полиморфизм ЯОР у эмбрионов 6,5–14 недель развития	383
--	-----

10.1.3.2. Полиморфизм ЯОР у плодов 20–24 недель развития	387
--	-----

10.1.4. Особенности наследования функциональной активности ЯОР	390
---	-----

10.1.5. Функциональный полиморфизм ЯОР у плодов человека с анеуплоидным кариотипом	394
---	-----

10.2. Метилирование ДНК как универсальный механизм регуляции активности генов

10.2.1. Метилирование ДНК и геномный импринтинг	406
---	-----

10.2.2. Инактивация X-хромосомы	409
---------------------------------------	-----

10.2.3. Болезни, обусловленные нарушениями метилирования	410
--	-----

10.2.4. Роль метилирования в онкогенезе	411
---	-----

10.2.5. Статус метилирования хромосом в эмбриогенезе человека	413
---	-----

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

10.3.1. Общая характеристика функционального статуса хромосом у эмбрионов человека	417
---	-----

10.3.2. Характеристика прицентромерных районов и коротких плеч acroцентрических хромосом	424
---	-----

10.3.3. Особенности функционального состояния районов прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9 и 16	425
--	-----

10.3.4. Особенности метилирования хромосом при анеуплоидии	427
--	-----

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

10.4.1. Принцип метода и новый вариант дифференциальной окраски — M-сегментация	429
--	-----

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

ГЛАВА 11

ГОРИЗОНТЫ ЦИТОГЕНЕТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО

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

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ГЛАВА 1

ОСНОВЫ ПРОЭМБРИОНАЛЬНОГО И ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Введение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.1 (продолжение)

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

Таблица 1.1 (окончание)

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

1.1. Проэмбриональный период

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

1.1.1. Гаметогенез

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

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

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

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

1.1.1.1. Сперматогенез

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

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



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

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

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

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

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

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

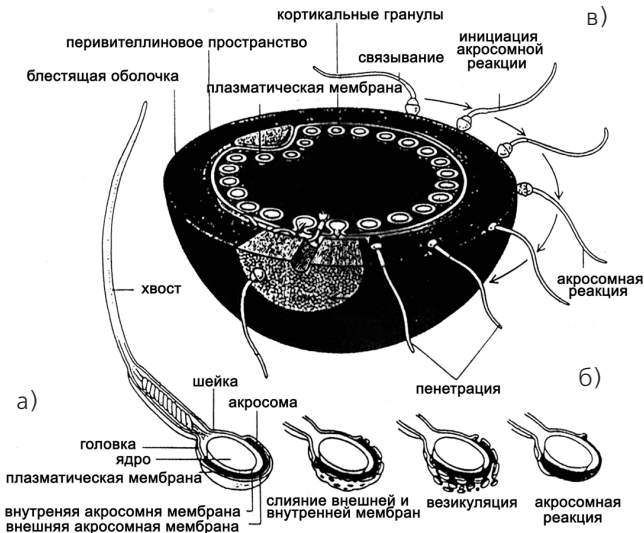


Рис. 1.2. Строение зрелого сперматозоида (а), акросомная реакция (б), последовательные этапы оплодотворения (в)

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

1.1.1.2. Оогенез

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

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

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

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