

ХАРЬКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

БЕРЕШЕВА Альфия Камиловна

**РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ
КОНСУЛЬТИРОВАНИИ СУПРУЖЕСКИХ ПАР
С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ
ФУНКЦИИ**

03.00.15 — генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Харьков— 1995

AB 31.812



Дис. 00756179 (Z) с рукописью.

Работа выполнена в Московском научно-исследовательском институте педиатрии и детской хирургии МЗ РФ.

Научные руководители: доктор биологических наук
Светлана Григорьевна Ворсанова
доктор медицинских наук,
профессор
Людмила Зиновьевна Казанцева

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор, академик УЭАН
Елена Яковлевна Гречанина
кандидат биологических наук
Елена Михайловна Климова

Ведущая организация: Киевский институт усовершенствования врачей, кафедра медицинской генетики.

Защита диссертации состоится « 24 » февраля 1995 г.
в 13 час. — мин. на заседании Ученого совета К 053.06.07 по
присуждению ученой степени кандидата биологических наук в
Харьковском Государственном Университете (310077, г. Харьков,
пл. Свободы 4, аудитория 3—15).

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке Харьковского государственного университета.

Автореферат разослан « 24 » января 1995 г.

Ученый секретарь
специализированного
Ученого совета
кандидат биологических наук

Некрасова

А. В. НЕКРАСОВА

Актуальность исследования. При определении повторного риска рождения больного ребенка и тактики пренатальной диагностики у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции (НРФ) ведущая роль принадлежит цитогенетическим методам исследования, необходимым для выявления хромосомных нарушений.

Известно, что традиционные цитогенетические методы не могут обеспечить эффективность выявления и анализа целого ряда патологических состояний, связанных с аномалиями хромосом, в том числе сложных хромосомных перестроек таких, как добавочная (маркерная) хромосома, случаи минимального хромосомного мозаицизма, а также сбалансированные хромосомные аномалии с точками разрыва в околоцентромерных гетерохроматиновых районах хромосом.

Последнее десятилетие характеризуется появлением принципиально новых подходов к диагностике наследственно обусловленной патологии и, прежде всего, хромосомных нарушений. Это стало возможным на базе использования хромосомоспецифичных ДНК-зондов, которые характерны только для определенных пар хромосом или их участков (Ю.Б.Юров, 1987; R.K.Mouzis et al., 1987; U.Muller et al., 1987; G.Muller, W.Schempp, 1989; Yu. B.Yurov et al., 1989). Используя ДНК-зонды, можно более точно и эффективно определить особенности хромосомного набора без прямого цитогенетического анализа с помощью метода радиоактивной и нерадиоактивной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (С.Г.Ворсанова и др., 1989; F.Speleman et al., 1990; P.Fouret, 1991; W.L.Kuo et al., 1991; A.T.Tharapel et al., 1991; E.S.Cantu et al., 1992; Yu.B.Yurov et al., 1993).

Молекулярно-цитогенетическая диагностика в течение ряда лет успешно применялась с целью пре- и постнатальной идентификации наследственных дефектов у детей с задержкой психи-

ческого развития, наличием множественных врожденных пороков и/или микроаномалий развития (С.Г. Ворсанова и др., 1993). Однако, до настоящего времени не получили достаточного освещения вопросы использования молекулярно-цитогенетических методов для определения тех или иных хромосомных нарушений при генетическом консультировании супружеских пар с НРФ.

Цель исследования: Определить возможности использования молекулярно-цитогенетических подходов к диагностике хромосомных нарушений при генетическом консультировании супружеских пар с НРФ.

Научные задачи: 1) установить с помощью классических цитогенетических методов частоту хромосомных аномалий и вариантов среди супружеских пар с НРФ; 2) идентифицировать сложные случаи "минимального" хромосомного мозаицизма, когда у одного из супругов выявляется небольшой процент аномальных клеток (до 15%); 3) определить у супружеских пар с НРФ происхождение добавочных (маркерных) или минихромосом с помощью метода гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*; 4) уточнить точки разрыва в гетерохроматиновых участках аномальных хромосом, вовлеченных в сложные хромосомные нарушения у супружеских пар с НРФ; 5) разработать, на основе проведенных исследований, комплекс информативных показаний для проведения молекулярно-цитогенетической диагностики при генетическом консультировании супружеских пар с НРФ.

Научная новизна. Впервые оценена диагностическая значимость молекулярно-цитогенетических методов при генетическом консультировании супружеских пар с НРФ. Впервые, на основе применения молекулярно-цитогенетических методов, стало возможным выявление у супружеских пар с НРФ случаев хромосомного мозаицизма с небольшим процентом аномальных клеток. Впервые, разработана тактика выявления происхождения маркерных хромосом (определение их генетического состава) у супружес-

ких пар с НРФ. Впервые, на основе использования молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, разработан способ молекулярного анализа сбалансированных и несбалансированных перестроек хромосом с точками разрыва в околоцентромерных гетерохроматиновых районах хромосом у супружеских пар с НРФ.

Научно-практическое значение работы. Разработаны показания для использования молекулярно-цитогенетической диагностики при генетическом консультировании супружеских пар с НРФ: 1) наличие в семье случаев гоносомного мозаицизма и/или псевдомозаицизма при многоэтапном цитогенетическом анализе; 2) наличие маркерной хромосомы у пробанда и членов семьи с целью установления ее происхождения (молекулярного состава); 3) наличие семейной структурной сбалансированной перестройки с точками разрыва в гетерохроматиновом околоцентромерном районе хромосом.

Внедрение молекулярно-цитогенетических методов в практическую медицину будет способствовать большей эффективности генетического консультирования семей и, следовательно, предупреждению распространения наследственной патологии в семье и обществе.

Апробация результатов исследования. Материалы работы доложены на: 2-ой Всесоюзной научно-практической конференции по цитогенетике человека (г. Москва, 1991 г.); 7-м Всесоюзном совещании "Структура и функция хромосом" (г. Пущино, 1991 г.); 2-ой итоговой конференции НИИ медицинской генетики (г. Томск, 1992 г.); 6-ом съезде общества генетиков и селекционеров (г. Минск, 1992 г.); на симпозиуме по медицинской генетике (г. Прага, ЧСФР, 1992); 3-ей конференции "Геном человека - 93" (г. Черногловка, 1993 г.), Европейском обществе генетиков человека (г. Барселона, Испания, 1993 г.), на заседаниях проблемной комиссии по генетике: МНИИП и ДХ МЗ России (г. Москва, 1993 г.), ХГУ (г. Харьков, 1993 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 7 в отечественной и 2 в зарубежной печати.

Личный вклад и участие в совместных публикациях заключается в практическом выполнении экспериментальных исследований, анализе и статистической обработке полученных данных, а также в обсуждении результатов эксперимента.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и указателя литературы, включающего 53 работы отечественные и 172 зарубежные. В тексте диссертации приводится 10 таблиц и 15 рисунков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Под наблюдением находилось 210 супружеских пар (420 индивидуумов), обратившихся в медико-генетический центр по поводу генетического прогноза в связи с наличием в анамнезе следующих событий: спонтанные аборт на разных сроках беременности, мертворождения, бесплодие, а также рождение ребенка с хромосомными аномалиями, множественными врожденными пороками и/или микроаномалиями развития. Контрольную группу составили 50 супружеских пар (100 индивидуумов) обратившихся, в основном, по поводу проспективного консультирования и не имеющих в анамнезе НРФ. При обследовании супружеских пар был использован **клинико-генеалогический метод**. Всем 520 индивидуумам обследованной и контрольной групп было проведено цитогенетическое исследование. При наличии сложных видов патологии, когда традиционные цитогенетические методы не могли решить проблему идентификации отдельных форм хромосомных нарушений, применялся молекулярно-цитогенетический анализ. Статистическая обработка полученных данных (подсчет зерен серебра) производилась по критерию знаков (В.Ю.Урбах, 1964).

Цитогенетические методы исследования проводились на препаратах метафазных хромосом, используя культивируемые лимфоциты периферической крови. Хромосомы идентифицировали после дифференциального окрашивания (G, C, Q - методы). В каждом случае анализировали не менее 11 метафазных пластинок. Отбор метафаз и анализ хромосом осуществляли согласно общепринятым критериям (Н.П.Кулешов, И.В.Лурье, 1984; Н.П.Кулешов, 1991). При обнаружении хромосомных вариантов применяли метод C-окрашивания хромосом (А.Т.Шиппер et al., 1971; С.Г.Борсанова и др., 1989). В случае обнаружения хромосомной нестабильности анализировали по 100 метафаз. Мозаицизм оценивался по математико-статистическим расчетам (Н.П.Кулешов, 1979, 1991).

Молекулярно-цитогенетические методы проводили в случаях, когда традиционный цитогенетический анализ был мало эффективен. Для идентификации хромосом в метафазных или интерфазных клетках, а также для уточнения точек разрыва в аномальных хромосомах использовались клонированные "классические" и альфа-сателлитные последовательности ДНК, специфичные для хромосом: 15 (ДНК-зонд pPD 18), 18 (pBRHS 13), 21 (альфа R1 6 - X (pYAM 10-40) и Y (pY 96). При определении происхождения маркерных хромосом использовались ДНК-зонды практически на все хромосомы человека, в том числе, pHSO5; pBRHS 13; pYAM 10-40; pPD 9.

Молекулярно-цитогенетическая диагностика на метафазных и интерфазных хромосомах проводилась радиоактивным и нерадиоактивным методами. Радиоактивная гибридизация клонированных последовательностей ДНК *in situ* осуществлялась по ранее описанной методике (J.G.Gall, M.L.Pardue, 1969, 1971; M.E. Chandler, J.J.Yunis, 1978; Ю.Б.Юров, 1984). После проведенного анализа оценивали потерю или дупликацию хромосомного материала на молекулярном уровне. Нерадиоактивный флуоресцентный метод гибридизации *in situ* (FISH) проводился на препаратах интерфазных ядер в случаях мозаицизма по методике (P.R.Langer, D.C. Ward, 1981; D.Pinkel, 1986) с модификациями принятыми в лаборатории цитогенетики человека (рук.д.б.н. Ю.Б.Юров) НЦ психического здоровья РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Цитогенетические исследования.

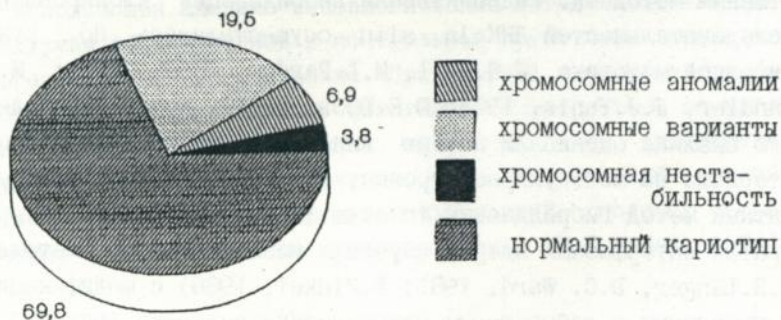
В результате анализа кариотипа 210 супружеских пар с нарушением репродуктивной функции у 29 из 420 пациентов (6,9%) были выявлены хромосомные аномалии; у 82 (19,5%) – хромосомные варианты; у 16 (3,8%) – хромосомная нестабильность, у остальных 293 (69,8%) каких-либо кариологических особенностей не наблюдали, т.е. кариотип был нормальным (рисунок I).

В контрольной группе у всех индивидуумов был выявлен нормальный кариотип, в котором не отмечалось каких-либо цитогенетических нарушений, вследствие этого в дальнейшем речь будет идти исключительно о супружеских парах с НРФ.

Почти у 1/5 супругов 82 случая (19,5%) были выявлены хромосомные варианты, связанные с увеличением гетерохроматиновых районов хромосом. Среди них встречались $1qh+$ – в 3,3%; $9qh+$ – в 8,3%; $16qh+$ – в 1,0%; $Yqh+$ – в 2,9% и сочетанные варианты в 4%. Можно предположить, что экстремальные варианты хромосом 1, 9, 16 и Y могут вести к НРФ. Широко обсуждаемый вопрос о том, могут ли экстремальные макро- и микроварианты C-гетерохроматина хромосом 1, 9, 16, и Y вести к НРФ – на сегодняшний день остается не полностью разрешенным.

Рисунок I

Удельный вес хромосомных особенностей у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции.



Полученные данные в обследуемой группе по выявлению хромосомной нестабильности трудно интерпретировать. В этом направлении необходимо дальнейшее наблюдение с увеличением выборки и последующим анализом.

Проведение цитогенетического исследования позволило среди супружеских пар с НРФ выявить группу 29 индивидуумов (6,9%) с хромосомными аномалиями. Большинство наблюдений было представлено гоносомным мозаицизмом выявленным у 14 из них (3,3%); у 12 (2,9%) - обнаружены сбалансированные транслокации, и в 3 случаях (0,7%) обнаружены маркерные хромосомы.

Молекулярно-цитогенетические исследования.

В 13 из 29 случаях (3 с маркерной хромосомой, 9 - с гоносомным мозаицизмом, в том числе изохромосома Xq, и 1 - со сбалансированной транслокацией) проводилось молекулярно-цитогенетическое исследование (табл. I).

Клонированные последовательности хромосомспецифичных ДНК-проб почти во всех проанализированных метафазных и интерфазных пластинках интенсивно гибридизовались с околоцентромерными районами хромосом, вовлеченных в хромосомные аномалии.

Для диагностики мозаицизма радиоактивную и нерадиоактивную гибридизацию нуклеиновых кислот *in situ* использовали на основании метафазного и интерфазного анализа хромосом. На данное исследование было направлено 12 пациентов. В эту группу входили индивидуумы с подозрением на мозаичную форму синдромов, а также лица, у которых цитогенетически был исключен аномальный клон, но в семье был ребенок с гоносомным синдромом. В результате анализа после гибридизации мозаицизм был установлен в 9 из 12 случаев. Среди них 4 синдрома Шерешевского-Тернера, 3 - трипло-Х, 1 - (сочетанный) Шерешевского-Тернера и трипло-Х и 1 - Клайнфельтера. Аномальный клон присутствовал в клетках с частотой от 5 до 15%.

ТАБЛИЦА № I Результаты молекулярно-цитогенетической диагностики супружеских пар с нарушением репродуктивной функции.

Ч И Л С И Л Ц О	Д И А Г Н О С Т И К А						
	КАРИОТИП (хромосомные аномалии)	Молекулярно-цитогенетическая				методы	
		АНАЛИЗ мета- фаз- ный	интер фаз- ный			*	*
					ISH	FISH	
1	47,XY, + mar	+	-	Установление проис- хождения хромосом der Y	+	-	
2	46,XX/ 47,XX, + mar	+	-	der X	+	-	
3	46,XX/ 47,XX, + mar	+	-	der 21	+	-	
				Определение числа аномальных клеток в %			
4	46,XX/45,X	+	+	85/15	-	+	
5	46,XX/45,X	+	+	86/14	-	+	
6	46,XX/45,X	+	+	обнаружен третий клон 47,XXX - /5 85/10	-	+	
7	46,XY/45,X	-	+	90/10	-	+	
8	46,XX/47,XXX	-	+	90/10	+	-	
9	46,XX,1qh+/ 47,XXX,1qh+	-	+	85/15	+	-	
10	46,XX/47,XXX	-	+	86/14	+	-	
11	46,XY/47,XXY	-	+	86/14	+	-	
12	46,XX/46,X,i (Xq)(qter->cen- >qter)/45,X	+	-	80/15/5	+	-	
13	45,XX,dic t (15;18)(15qter- >cen->15p11:::- 18p11.321->cen- >18qter	+	-	УТОЧНЕНИЕ ТОЧЕК РАЗ- РЫВА В АЛЬФОИДНОЙ ДНК (нет потери материала хромосом)	+	-	

* ISH - in situ гибридизация (изотопный метод)

* FISH - флуоресцентная in situ гибридизация (нерадиоактивный метод)

Учитывая то, что на основе малого объема материала можно быстро и точно определить и установить "скрытый" мозаицизм, диагностика подобных случаев осуществлялась, в основном, на интерфазных ядрах после гибридизации *in situ*. Данные интерфазного анализа были параллельно проведены и подтверждены на метафазных клетках в трех случаях, где процент аномальных клеток был также низким (до 15%). Мозаицизм у 7 индивидуумов был представлен двумя клонами клеток, в двух случаях выявлен аномальный третий клон в 5% клеток (табл. I).

При использовании альфаидной ДНК-пробы РYAM 10-40, которую метили радиоактивно, были диагностированы синдромы Шерешевского-Тернера, Клайнфельтера и трипло-Х. Для диагностики синдрома Шерешевского-Тернера применяли этот же ДНК-зонд РYAM 10-40 меченный биотином, т.е. использовался метод FISH-флуоресцентной *in situ* гибридизации (табл. I). Одной пациентке с данным синдромом, у которой наблюдался аномальный клон по изохромосоме Xq, проводили радиоактивную гибридизацию *in situ*. Данная патология была обнаружена также у ее ребенка.

Известно, что у носителей изохромосомы по длинному плечу X,1(Xq) развивается синдром Шерешевского-Тернера, поскольку аномальная хромосома всегда инактивирована и активной остается только одна нормальная хромосома - X. В данной ситуации у женщины с изохромосомой Xq не отмечались признаки синдрома Шерешевского-Тернера, но при этом присутствовал аномальный клон 46,X,1(Xq)(qter->cen->qter) в низком проценте 15%,

а также в 5% клеток клон 45,X. При количественном анализе полученных данных было установлено, что изохромосома Xq содержала два неизмененных длинных плеча, большую часть околоцентромерного гетерохроматина обеих хромосом, а два коротких плеча были полностью утрачены. Результаты свидетельствовали о том, что количество зерен серебра в 1,5 раза больше над изохромосомой Xq, чем над нормальной хромосомой X. При статистической обработке произведено сравнение по критерию знаков, где $p < 0,001$.

Исходя из изложенного, можно считать, что одним из показаний к проведению молекулярно-цитогенетической диагностики у супружеских пар с НРФ служит наличие гоносомного мозаицизма в семье и/или псевдомозаицизма при многоэтапном цитогенетическом анализе.

Анализ кариотипа и определение происхождения маркерных хромосом проводился радиоактивным методом гибридизации *in situ* у 3-х пациентов. Во всех случаях, как видно из рисунка 2, маркерные хромосомы идентифицированы, как дериват хромосом 21, X и Y. При количественном анализе числа зерен серебра над гомологами хромосом (21, X, Y) и маркерными хромосомами оказалось, что интенсивность гибридизации одинакова, т.к. число зерен серебра над маркерными и нормальными хромосомами существенно не различалось. Учитывая результаты цитогенетического и молекулярно-цитогенетического анализа клеток пациентов, кариотипы были следующими: 47,XY,+mar(der Y); 46,XX/47XX,+mar(der X) и 46,XX/47,XX,+mar(der 21) (табл. I). Полученные данные позволяют более эффективно проводить своевременную пренатальную диагностику. Следует отметить, что при обнаружении маркерной хромосомы у плода, идентичной фенотипически здоровым членам семьи беременность, по-видимому, необходимо сохранить. При определении происхождения маркерной хромосомы отличной от семейной, беременность вероятно следует прервать.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие маркерной хромосомы, как у супружеских пар, так и их детей, является необходимым показанием для проведения молекулярно-цитогенетической диагностики.

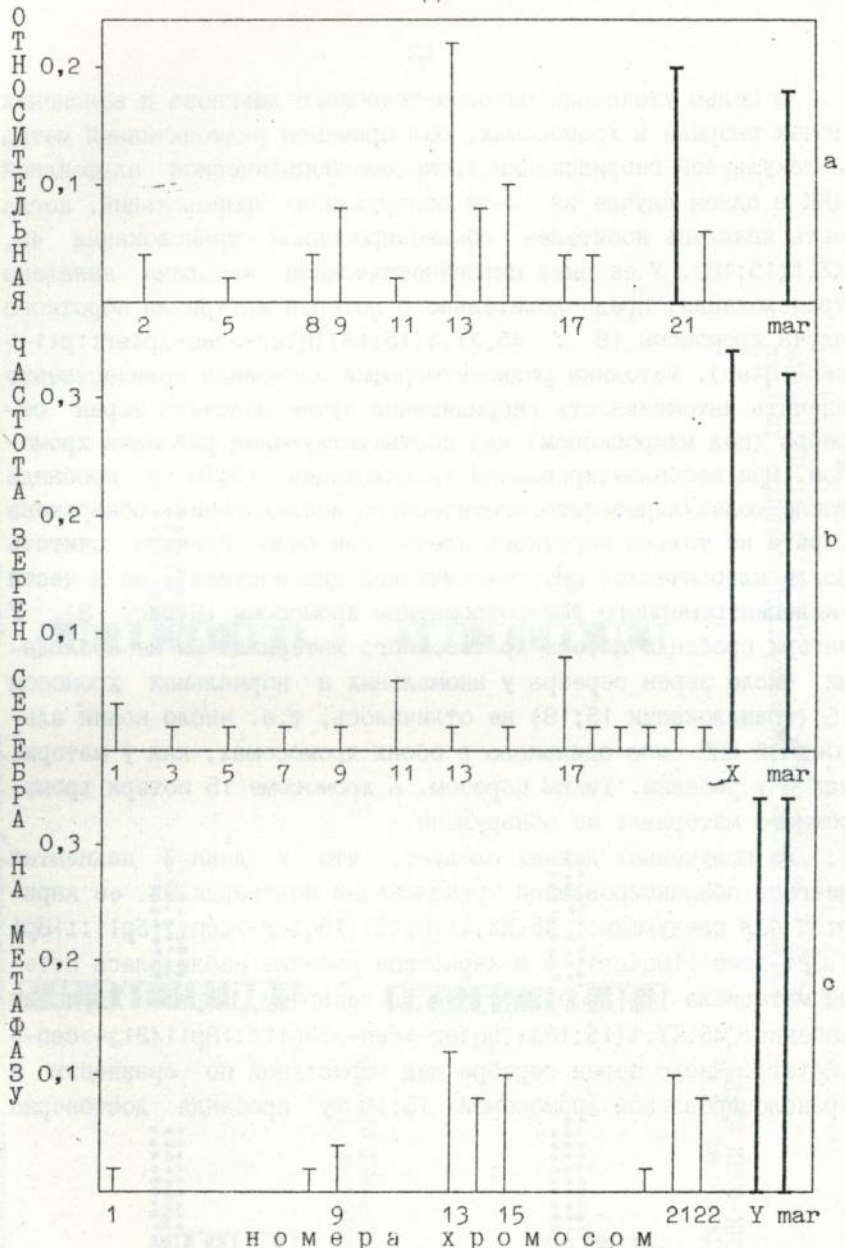


Рис. 2 Идентификация дополнительных маркерных хромосом с помощью гибридизации *in situ* хромосомоспецифичных ДНК-проб. а) маркерная хромосома - der21 (ДНК-зонд альфаR16); б) маркерная хромосома - derX (ДНК-зонд рУАМ 10-40); в) маркерная хромосома - der Y (ДНК-зонд рУ96).

С целью уточнения цитогенетического диагноза и выяснения точек разрыва в хромосомах, был применен радиоактивный метод молекулярной гибридизации хромосомоспецифической альфаидной ДНК в одном случае из 12-ти обнаруженных транслокаций, когда мать являлась носителем сбалансированной транслокации 45, XX, t(15;18). У ее сына цитогенетическими методами выявлена транслокация, предположительно с потерей материала короткого плеча хромосомы 18 : 45, XY, t(15;18)(qter->cen->pter::p11->cen->qter). Методика радиоавтографии позволила количественно оценить интенсивность гибридизации путем подсчета зерен серебра (под микроскопом) над соответствующими районами хромосом. При несбалансированной транслокации 15;18 у пробанда после молекулярно-цитогенетического исследования обнаружена утрата не только короткого плеча (как было принято считать после классической цитогенетической диагностики), но и части околоцентромерного гетерохроматина хромосомы 18 (рис. 3). У матери пробанда потерю хромосомного материала мы не наблюдали. Число зерен серебра у аномальных и нормальных хромосом 15 (транслокации 15;18) не отличалось, т.е. число копий альфаидной ДНК было одинаково в обоих хромосомах, как у матери, так и у ребенка. Таким образом, в хромосоме 15 потери хромосомного материала не обнаружено.

Из полученных данных следует, что у данной пациентки диагноз сбалансированной транслокации подтвердился, ее кариотип был следующим: 45, XX, t(15;18)(15qter->cen->15p11::18p11.321->cen->18qter), а в кариотипе ребенка наблюдалась потеря материала 18p, соответствующая синдрому 18p-. Кариотип ребенка: 45, XY, t(15;18)(15qter->cen->15p11::18p11(31)->cen->18qter). Число зерен серебра над нормальной по сравнению с транслоцированной хромосомой 15;18 у пробанда достоверно

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСЛОКАЦИИ 15;18.

Рис. № 3

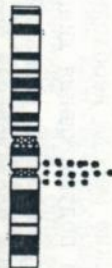
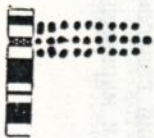
Нормальная
хромосома

Сбалансированная
транслокация у матери

Несбалансированная
транслокация у сына



хромосома 15
ДНК-зонд pPD 18



хромосома 18
ДНК-зонд pBRHS 13

кариотип после проведения гибридизации in situ
 45, XX, t(15;18)15qter-> 45, XY, t(15;18)15qter->
 cen->15p11::18p11.321-> cen->15p11::18p11.(31)->
 ->cen->18qter ->cen->18qter

больше, где $p < 0,001$. Следует отметить, что у матери не наблюдалось такой разницы при сравнении нормальной хромосомой 18 и транслоцированной хромосомой 15;18. Из рисунка 3 видно, что при использовании ДНК-зонда рBRHS 13 на хромосому 18 наблюдалось достоверное отличие по количеству зерен серебра в околоцентромерном гетерохроматиновом районах транслоцированной хромосомы 15;18 у матери и пробанда.

Таким образом, в случаях структурных перестроек с точками разрыва в гетерохроматине околоцентромерных участков хромосом, для уточнения диагноза (точек разрыва и воссоединения на аномальных хромосомах), показано проведение молекулярно-цитогенетической диагностики, как супружеским парам с нарушением репродуктивной функции, так и их детям.

Полученные данные позволяют отметить, что молекулярно-цитогенетические методы необходимо применять, как с целью уточнения или подтверждения диагноза, так и для молекулярного изучения хромосомных аномалий.

Проведенные исследования позволили доказать целесообразность и высокую эффективность использования молекулярно-цитогенетических методов диагностики в генетическом консультировании семей с НРФ.

ВЫВОДЫ

1. Цитогенетическое обследование 210 супружеских пар с нарушением репродуктивной функции (420 индивидуумов) позволило установить у 127 индивидуумов (30,2%) - различные хромосомные особенности, в том числе: - у 82 (19,5%) различные хромосомные варианты, у 29 (6,9%) хромосомные аномалии, у 16 (3,8%) хромосомную нестабильность.

2. Структура 29 хромосомных аномалий среди супружеских пар с нарушением репродуктивной функции представлена мозаицизмом аномалий гоносом - у 14, сбалансированными транслокациями - у 12 и маркерными хромосомами - у 3.

3. Частота экстремальных хромосомных вариантов, связанных с увеличением околоцентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16 и Y, среди супружеских пар с нарушением репродуктивной функции составила 19,5%, в том числе наблюдались варианты 1qh+ - (3,3%), 9qh+ - (8,3%), 16qh+ (1,0%), Yqh+ - (2,9%), и сочетанные варианты - (4%).

4. Применение молекулярно-цитогенетических методов позволило в 9 (из 12) случаях обследования супружеских пар с нарушением репродуктивной функции выявить "скрытый" хромосомный мозаицизм, обнаруженный при небольшом проценте аномальных клеток (до 15%).

5. Идентифицировано происхождение маркерных хромосом с помощью молекулярно-цитогенетического метода у трех индивидумов из супружеских пар с нарушением репродуктивной функции. Добавочные хромосомы классифицированы, как дериват 21, X и Y, что имеет значение для определения тактики генетического консультирования и пренатальной диагностики.

6. Разработан способ молекулярного анализа сбалансированных и несбалансированных перестроек с точками разрыва в околоцентромерных гетерохроматиновых районах хромосом, на основе использования молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.

7. Разработаны показания для использования молекулярно-цитогенетической диагностики при генетическом консультировании супружеских пар с нарушением репродуктивной функции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. С.Г.Ворсанова, Л.З.Казанцева, А.К.Берешева, И.А.Демидова, Ю.Б.Юров. Результаты молекулярно-цитогенетической диагностики супружеских пар с нарушением репродуктивной функции при медико-генетическом консультировании. //Сб-к научных трудов "Молекулярная диагностика наследственных болезней и медико-генетическое консультирование". Москва, 1994, 9 стр.

2. С.Г.Ворсанова, Ю.Б.Юров, И.А.Демидова, Н.В.Вехова, А.К.Берешева, В.О.Шаронин. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий при медико-генетическом консультировании детей с недифференцированными формами умственной отсталости. // Сб-к научных трудов "Молекулярная диагностика наследственных болезней и медико-генетическое консультирование". Москва, 1994, 6 стр.

3. С.Г.Ворсанова, А.К.Берешева, Л.З.Казанцева, Ю.Б.Юров. Хромосомные аномалии у супружеских пар с отягощенным акушерским анамнезом по данным молекулярно-цитогенетических исследований. // Материалы 2-ой итоговой конференции НИИ Мед. Генетики "Генетика человека и патология", Издательство Томского Университета, г. Томск, 1992, 2 стр.

4. С.Г.Ворсанова, Л.З.Казанцева, А.К.Берешева, И.А.Демидова, Ю.Б.Юров. Молекулярно-цитогенетическая диагностика у супружеских пар с отягощенным акушерским анамнезом. // "Российский вестник перинатологии и педиатрии", Москва, 1994, 1 стр.

5. S.G.Vorsanova, Yu.B.Yurov, A.K.Beresheva. Molecular analysis of the chromosomal breakpoints in patients with balanced and nonbalanced translocations. // European society of human genetics. 25th annual meeting, Barcelona, Spain, 1993, 1 стр.

6. С.Г.Ворсанова, Ю.Б.Юров, И.А.Демидова, А.К.Берешева. Альфоидные и "классические" сателлитные ДНК-пробы для идентификации маркерных хромосом человека. // Сб-к тезисов 3-ей конференции "Геном человека - 93", Москва, 1993, 1 стр.

7. S.G.Vorsanova, Yu.B.Yurov, I.A.Demidova, A.K.Beresheva, N.V.Vechova, V.O.Sharonin. Diagnosis of chromosomal abnormalities in children with mental retardation. // Satellite symposium of Mendel forum "Genetics in medicine", Prague, Czechoslovakia, 1992, 1 стр.

8. С.Г.Ворсанова, И.А.Демидова, А.К.Берешева, Н.В.Вехова, В.О.Шаронин. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий.// Материалы VI съезда общества генетиков и селекционеров им.Н.И.Вавилова, г.Минск, 1992, 1 стр.

9. С.Г.Ворсанова, Ю.Б.Юров, И.А.Демидова, А.К.Берешева, Н.В.Николаева, Т.Н.Бурова, Л.З.Казанцева, П.В.Новиков. Цитогенетическая и молекулярно-цитогенетическая диагностика в республиканском детском центре наследственной патологии.// Сб-к тезисов 2-ой Всесоюзной научно-практической конференции по цитогенетике человека, Москва, 1991, 1 стр.

Beresheva Alpha Kamilovna. Theme of dissertation: "The role of molecular-cytogenetic diagnosis in genetic consultation of married couples with disorder of reproductive function". Dissertation on competition of academic degree of candidate of biological sciences. Speciality 03.00.15 - Genetics; 1995, manuscript of the dissertation.

In the article the results of cytogenetic and molecular-cytogenetic diagnosis of married couples with disorder of reproductive function are observed.

Thesis shows the necessity of molecular diagnosis with application of chromosome-specific DNA probes in cases of mosaicism with small percent of abnormal cells, balanced translocations with rupture in centromeric heterochromatic region of chromosomes and marker chromosomes.

Берешева Альфія Камілівна. Роль молекулярно-цитогенетичної діагностики в генетичному консультуванні подружжя з порушенням репродуктивної функції. Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук. Спеціальність 03.00.15 - Генетика; 1995, рукопис дисертації.

В роботі представлені результати цитогенетичної і молекулярно-цитогенетичної діагностики у подружжя з порушенням репродуктивної функції.

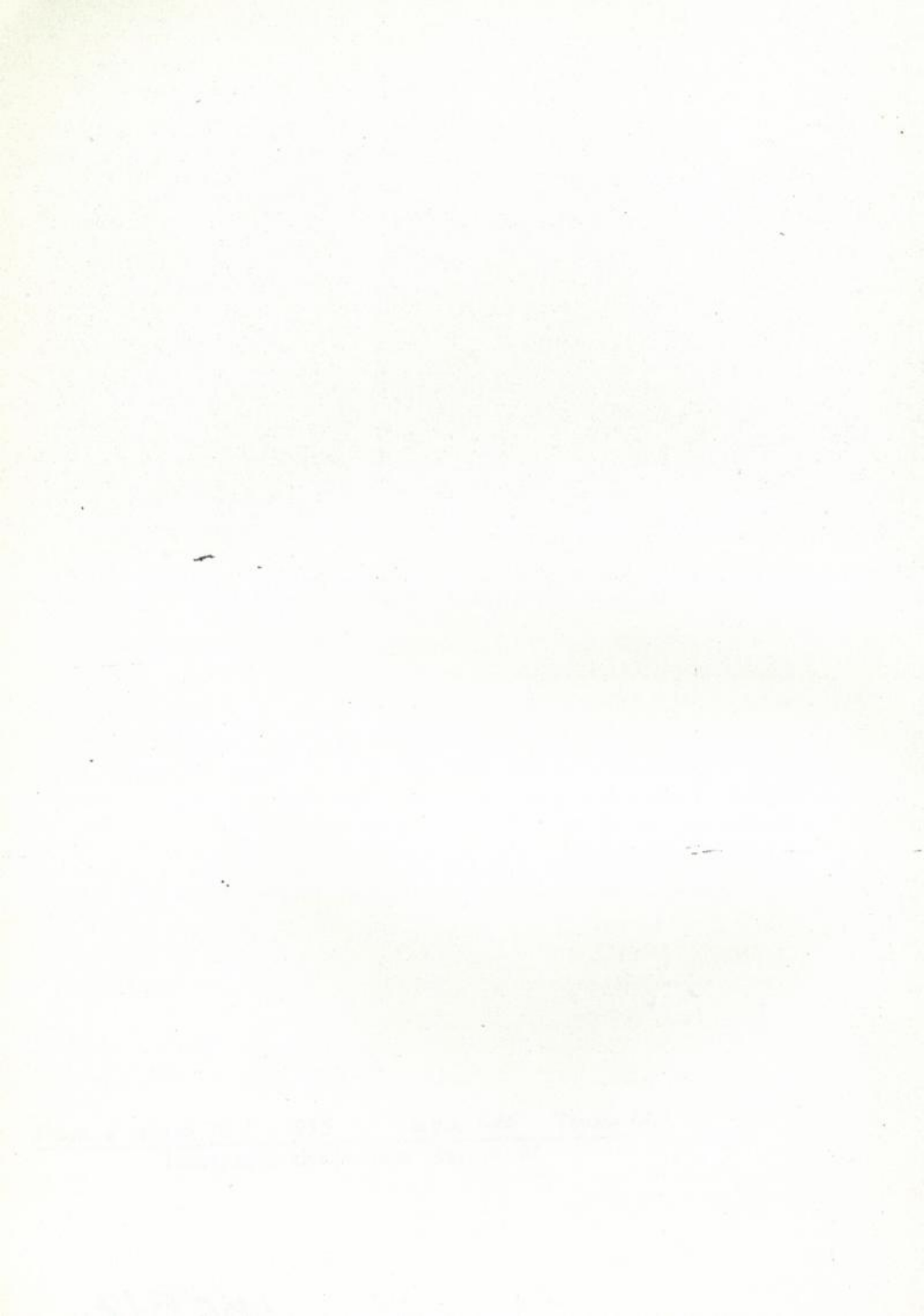
Ключові слова: (хромосома, мозаїцизм, транслокація, маркерна хромосома, ДНК-зонд, гібридизація нуклеїнових кислот in situ, FISH).

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Подп. к печати 16. I 1995 г. ф.п.л. 1,25 Тираж 120

Типография «Нефтяник» Зак. № 17

456513



456513

AB 31.812

AB 31.812