Возможности тестирования процессов митоза и мейоза женских и мужских половых клеток

Л.Ф. Курило, С.Ш. Хаят

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

Контакты: Любовь Федоровна Курило kurilo@med-gen.ru

Количественный анализ состава незрелых половых клеток, их патологии в митозе и мейозе (из эякулята, яичника эмбрионов и плодов млекопитающих, биоптатов гонад или их фрагментов от секционного материала) как информативный метод необходимо внедрять в практику диагностики андрологических и гинекологических клиник, при обследовании пациентов, в экспериментальные исследования. Разработку количественного анализа состояния митоза и женского мейоза начинали на экспериментальных животных и гонадах плодов от спонтанных или медицинских абортот.

Ключевые слова: половые клетки, ооциты, сперматоциты, оогенез, сперматогенез, митоз, мейоз, профазы, метафазы, анафазы, телофазы, хромосомы, конъюгация, дегенерация

DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-4-28-37

Testing of mitosis and meiosis in female and male gametes

L.F. Kurilo, S.Sh. Khayat

Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia

Method of quantitative evaluation of the immature germ cells, their pathology in mitosis and meiosis (in semen, embryo and fetal ovaries, of gonad biopsies or fragments of sectioned material) is informative method and should be introduced into the clinical practice in andrology and gynecology and fundamental research. Quantitative analysis of mitosis and female meiosis development was initiated on experimental animals and fetal gonads from spontaneous or therapeutic abortions.

Key words: germ cells, oocytes, spermatocytes, oogenesis, spermatogenesis, mitosis, meiosis, prophase, metaphase, anaphase, telophase, chromosomes, conjugation, degeneration

Введение

Половые клетки — единственные из более чем 230 типов клеток многоклеточного организма, из которых при оплодотворении развивается новый организм. Исследование наследственных (Н) заболеваний половой системы (ЗПС) имеет свою специфику, так как наследственная, как и иная форма ЗПС, в отличие от патологии других систем организма, должна оцениваться не только ущербом здоровью конкретного пациента, но и влиянием заболевания на его половые клетки и фертильность, на здоровье потомства. Поэтому необходимы дальнейшая разработка и использование в медицинской практике методов оценки состояния половых клеток, их митоза и мейоза как для диагностики, так и для профилактики наследственных ЗПС.

Эволюционно закреплено, что наиболее жизнеспособными являются организмы, развивающиеся вследствие полового процесса, оплодотворения при участии 2 половых клеток (гамет) разного пола. Каждая из них вносит в потомство свой уникальный генотип, который «обновляется» в каждой гамете при прохождении ею

процесса дифференцировки от первичной половой клетки (ППК) до зрелой, готовой к оплодотворению гаметы. Длительный и многостадийный гаметогенез (как для женских, так и для мужских гамет, для оогенеза и сперматогенеза соответственно) направлен на прохождение в гаметах уникального процесса обмена участками между материнской и отцовской гомологичными хромосомами (рекомбинация материала гомологичных хромосом при кроссинговере на стадии пахитены профазы I мейоза). Затем при 2 последовательных делениях мейоза каждая из гомологичных родительских хромосом (в анафазе I мейоза) и хроматиды (в анафазе II мейоза) расходятся от экваториальной пластинки к противоположным полюсам независимо от направления к тому или иному полюсу других хромосом и хроматид. Такая неоднократная рекомбинация хромосом (генома) между дочерними клетками в 1-м и 2-м делениях мейоза обеспечивает в каждом поколении гамет, в каждом геноме каждой половой клетки формирование уникального набора генов от геномов обоих родителей, что повышает жизнеспособность

и приспособляемость к меняющимся условиям обитания нового развивающегося организма.

Половые клетки обособляются от соматических на ранних стадиях развития. У 14–15-дневного эмбриона человека выявлены ППК, характеризующиеся наличием гликогена и высокой активностью щелочной фосфатазы [1]. Из области эпибласта они мигрируют пассивно (по развивающимся сосудам) и активно (амебоидное перемещение с помощью хемотаксиса) к зачаткам гонад (половым валикам). Последние формируются на вентральной стороне мезонефроса (первичной почки) из мезотелия. По гистологической структуре яички отличаются от яичников (различия вследствие дифференцировки по полу) уже к 16-й постсомитной стадии (т. е. после 3-й недели развития). В процессе миграции ППК к половым валикам и последующей дифференцировки гамет, заселивших гонады, и ППК, и гонии — следующий этап их развития (в гонаде) — делятся митозом, формируя определенный запас гамет в гонадах.

В яичниках у 4-месячных плодов человека при нормально протекающей беременности формируется резерв — 2–7 млн половых клеток [2, 3] (ооцитов в диплоте профазы I мейоза, заключенных в примордиальные фолликулы). При наступлении полового созревания человека циклически из этого резерва по несколько фолликулов с заключенными в них ооцитами будут вступать в дальнейший рост и созревание для овуляции (одного из созревающих ооцитов) и дегенерации или трансформации в гормонопродуцирующие структуры (желтые и белые тела) остальных растущих ооцитов. Таким образом, для формирования необходимого резерва половых клеток и в яичниках, и в яичках необходима пролиферация гониев. Разница заключается лишь в том, что резерв половых клеток в яичниках формируется антенатально у плода женского пола, с помощью митозов оогониев, а расходуется (через мейотические преобразования ооцитов 1 и 2) с периода половой зрелости (рис. 1); в яичках у плода мужского пола формируется определенный запас гамет, но лишь в половозрелом

Рис. 1. Хронология и динамика оогенеза человека (Курило Л.Ф., 1983)

организме регулярно в митоз вступают определенные типы гониев, которые после деления митозом переходят в сперматоциты I, вступающие в профазу мейоза I. После профазы мейоза I проходят метафаза, анафаза и телофаза I мейоза, после чего — метафаза, анафаза и телофаза II мейоза, сменяющиеся спермиогенезом, формируются сперматиды, дифференцирующиеся в сперматозоиды (рис. 2).

Результаты количественного анализа митотической активности половых клеток могут свидетельствовать о неблагополучии условий обитания субъекта, о наличии в его организме аномалии регуляции пролифера-

ции в гаметях или, наоборот, об эффективном влиянии терапии (или изменений условий обитания, устранения профессиональных или иных вредных факторов и др.) и о пребывании половых клеток в физиологических условиях для их дальнейших этапов дифференцировки и участия в оплодотворении. Однако нарушение прохождения клеткой митоза (т. е. процесса формирования пула, резерва половых клеток в гонадах, что необходимо для рождения новых поколений) индуцирует различные последствия: блок митоза на его определенных стадиях, что приводит к снижению оптимального числа гамет в организме и бесплодию; формирование гамет

Рис. 2. Схема сперматогенеза человека (Курило Л.Ф., 1989 г.)

с генными или хромосомными мутациями (числовыми и структурными). Наиболее опасными являются такие мутации, которые не приводят к гибели самой гаметы и сохраняют ее жизнеспособность и участие в оплодотворении. Это является одной из причин развития ребенка с генной или хромосомной патологией. То есть поражение гамет (в том числе через митоз или мейоз с патологией) является наиболее опасным для организма, потомства и вида в целом.

Использование количественного анализа патологии митоза и мейоза гамет (оогониев и сперматогониев, ооцитов и сперматоцитов) должно стать одним из методов тестирования повреждающих факторов и условий обитания, расшифровки механизмов бесплодия, формирования патозооспермии.

Классификацию патологических митозов соматических клеток разработал и предложил к использованию проф. И.А. Алов [4, 5]. Затем представления о развитии патологии митоза соматических клеток были расширены в исследованиях этого процесса при некоторых формах онкологических заболеваний [6, 7], а также в экспериментах по воздействию на клетки в системе *in vitro* и *in vivo* различными соединениями [8–14]. Но информация о механизмах индукции патологии митоза и мейоза гамет крайне фрагментарна. Судьба патологически делящихся гамет практически не определена и во многом зависит от степени поражения ахроматинового аппарата, самих генов и хромосом, от длительности пребывания таких гамет в состоянии нарушенного митоза или мейоза. В норме число гамет в дегенерации (в том числе находящихся в митозе или мейозе) невелико до стадии зиготены и они представлены единичными интерфазными или делящимися гаметами (гониями или цитами). Подавляющее число гамет в дегенерации в нормальных гонадах представлены клетками на стадиях зиготены и пахитены, а затем диплотены профазы I мейоза. Это объяснимо теми событиями, которые происходят при конъюгации и кроссинговере, — разрывом участков хромосом с последующим их соединением. При этом именно на данных стадиях наиболее активно функционирует система восстановления (репарации) разрывов [15]. После этих событий при процессе образования фолликула вокруг ооцитов в диплотене также определенная часть этих ооцитов переходит в дегенерацию. Индуцирует ли сам процесс фолликулообразования дегенерацию некоторых ооцитов или это является проявлением последствий недостаточного восстановления ооцитов после кроссинговера хромосом — вопрос, ожидающий решения.

В настоящее время исследования по тестированию гаметотоксического и гонадотоксического эффектов факторов остаются на стадии изучения [16–18]. Разработаны и функционируют эпидемиологические, клинические и экспериментальные подходы к их выявлению. Анализируются многие этапы репродуктивного

процесса в мужском и женском организмах, но данные исследования не охватывают оогенез и сперматогенез, митоз и мейоз гамет [16–18]. Существуют единичные сообщения о норме и нарушениях хронологии и динамики этих многостадийных и длительных по времени, существенных процессов дифференцировки гамет. Нами выполнены серии количественных исследований хронологии, динамики преобразований структур дифференцирующихся женских и мужских гамет, последовательных стадий оогенеза и сперматогенеза (в том числе митоза и мейоза) у человека, коровы, мыши, крысы, зеленой мартишки в норме и при воздействии некоторых физических и химических факторов. При этом мы не только установили последовательность морфологических преобразований хромосом и других компонентов ядер гамет на разных стадиях, но и разработали критерии и систему оценки состояния гамет и их структур, процессов дифференцировки (некоторых стадий, в том числе митоза и мейоза) и создали возможность оценки этих процессов и их нарушений: хронология всех последовательных стадий дифференцировки женских и мужских гамет, динамика фолликулообразования, спермиогенеза и др., дегенерация гамет. Установлено, что введение в определенные сроки беременности мышам или крысам ТиоТЭФ, окситетрациклина, алкоголя, никотина или 17- β -эстрадиола приводит к снижению резерва половых клеток у потомства I поколения. Выявлено, что гоноциты и гонии, особенно митотически делящиеся, являются более чувствительными к повреждающим факторам. Более того, все используемые нами агенты оказывали на гаметы плодов пролонгированное повреждающее действие. Последнее проявляется у эмбрионов или плодов не только при введении беременным самкам этого фактора, но и через различные интервалы времени после его введения. Например, выявлено снижение числа овулирующих яйцеклеток у половозрелого потомства мышей, при беременности которыми их матерям вводили окситетрациклин (в терапевтической дозе). В сперматогенезе потомства мужского пола отмечено нарушение метафаз, ана-/телофаз гониев (табл. 1–3) [13, 14, 18–25]. Это свидетельствует о необходимости более широкого исследования именно гаметотоксических свойств повреждающих факторов (в первую очередь эффекта их на митоз и мейоз), включающих мутагенный и более общие гамето- и гонадотоксический эффекты [13, 14, 18–25].

Результаты этих исследований позволили расширить критерии оценки состояния митоза гамет при диагностических исследованиях и тестировании повреждающего воздействия различными факторами на митоз и мейоз половых клеток, формирование половых желез, а также совершенствовать профилактические мероприятия, направленные на защиту половых клеток от повреждающих воздействий в целях сохранения здоровья будущих поколений, поскольку оно во многом

Таблица 1. Количественные характеристики состава половых клеток в яичках эмбриона и плода человека (Хилькевич, Курило, 1992)

Возраст эмбриона, нед	Число исследованных эмбрионов	Доля половых клеток, % от общего числа клеток семенных тяжей (канальцев)	Доля от общего числа подсчитанных половых клеток, %			Доля патологических митозов, % от общего числа митозов половых клеток	Диаметр ядра половых клеток, мкм
			преплетенная конденсация хромосом	дегенерация половых клеток	митозы половых клеток		
6–7	11	3,7 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,8	3,3 ± 1,5	8,4 ± 2,2 ^f	26,0 ± 11,3	8,1 ± 0,1
7,5–9,0	7	7,3 ± 1,2 ^b	4,3 ± 1,7	5,7 ± 1,6	1,6 ± 0,6 ^g	20,6 ± 4,0	8,3 ± 0,1
10–11	4	12,7 ± 1,2 ^c	14,2 ± 6,0	4,9 ± 2,5	0,3 ± 0,3	25,0	8,2 ± 0,2
14–16	4	16,4 ± 1,0 ^d	5,0 ± 1,5	5,8 ± 3,3	0,4 ± 0,3	0	8,0 ± 0,1
18–20	3	14,1 ± 1,0	5,5 ± 2,0	5,1 ± 1,0	0,2 ± 0,1	0	8,2 ± 0,2
21–24	5	12,3 ± 1,2 ^e	2,6 ± 0,4	6,7 ± 2,1	0,05 ± 0,05	0	8,3 ± 0,1
32	1	13,4	3,0	2,6	0	0	8,9 ± 0,1

Примечание. Различия статистически достоверны ($p < 0,05$) между a и b, b и c, c и d, d и e, f и g.

Таблица 2. Нарушение пролиферации оогониев плодов человека 6–10 нед развития после инкубации яичников *in vitro* с окситетрациклином или 17β-эстрадиолом ($M \pm m$) (Курило и соавт., 1985)

Воздействие	Число исследованных яичников	Количество оогониев среди подсчитанных половых клеток, %	Доля митотически делящихся оогониев среди всех оогониев, %	Количество метафаз среди всех делящихся оогониев, %	Количество анафаз и телофаз среди всех делящихся оогониев, %	Доля патологических митозов среди всех делящихся оогониев, %
Контроль	10	94,0 ± 1,45	2,51 ± 0,42	52,20 ± 8,05	27,80 ± 9,18	28,50 ± 5,54
Окситетрациклин 1000 мкг/мл, 4 ч, p	3	91,80 ± 1,00 0,1	1,09 ± 0,33 < 0,05	67,46 ± 25,72 0,1	10,32 ± 5,21 0,1	43,65 ± 28,18 0,1
Окситетрациклин 10 мкг/мл, 4 ч, p	5	95,64 ± 1,72 0,1	5,40 ± 1,48 0,1 > p > 0,05	63,80 ± 11,74 0,1	18,58 ± 5,13 0,1	26,20 ± 7,2 0,1
17β-эстрадиол, 10 мкг/мл, 4 ч, p	6	97,38 ± 0,61 < 0,05	3,47 ± 0,44 0,1	70,22 ± 9,3 0,1	7,52 ± 4,03 0,1 > p > 0,05	48,04 ± 6,62 < 0,05

Таблица 3. Показатели митотического режима оогониев в яичниках плодов мышей в экспериментах с окситетрациклином *in vivo* и *in vitro* ($M \pm m$) (Игнатьева, Курило, 1984)

Условия эксперимента	Число половых клеток	Доля половых клеток от общего числа всех подсчитанных клеток, %	Доля митозов среди оогониев, %	Доля среди митозов оогониев, %				
				патологические митозы	атретические митозы	профаза	метафаза	анателофаза
<i>In vivo</i> : контроль (6)	6102	22,5 ± 2,1	33,0 ± 2,1	5,6 ± 0,4	2,8 ± 0,6	55,0 ± 3,1	37,9 ± 3,0	4,2 ± 1,0
опыт (4)	3831	21,1 ± 2,1	28,0 ± 4,2	13,7 ± 2,8	6,7 ± 1,5	56,8 ± 5,1	30,1 ± 3,6	5,7 ± 2,4
p		> 0,1	> 0,1	< 0,05	< 0,05	> 0,1	> 0,1	> 0,1
<i>In vitro</i> : контроль (3)	2603	23,4 ± 3,4	35,4 ± 4,3	5,8 ± 0,4	1,7 ± 0,2	65,5 ± 2,9	31,2 ± 3,5	1,9 ± 0,2
опыт (3)	2376	21,3 ± 3,5	34,5 ± 2,5	13,7 ± 0,9	4,9 ± 1,4	63,5 ± 2,1	29,7 ± 2,8	3,1 ± 0,5
p		> 0,1	> 0,1	< 0,002	0,05 < p < 0,1	> 0,1	> 0,1	0,05 < p < 0,1

Примечание. В скобках — число плодов.

зависит именно от состояния гамет родителей [13, 14, 18, 19, 25].

У эмбриона и плода человека при формировании половых желез (яичников или яичек) мигрирующие

в них из эпибласта ППК несколько раз делятся митозом, затем хронология их дальнейшей дифференцировки зависит от пола эмбриона. У эмбрионов женского пола в яичниках половые клетки после завершения

последнего митоза, премейотического синтеза ДНК (в прелептотене, перед лептотеной) переходят в мейоз. Профаза I мейоза, в отличие от профазы митоза, — длительный, многостадийный процесс, состоящий из прелептотены, лептотены, зиготены, пахитены, диплотены, диктиотены [19, 26]. Нами количественным методом у плодов женского пола выявлена хронология и динамика оогенеза и показано реальное существование и функционирование стадий прелептотенной конденсации и деконденсации хроматина у человека, коровы, крысы, мыши. У эмбрионов/плодов женского пола на стадии диплотены мейоз останавливается и возобновляется лишь при наступлении полового созревания (т. е. в среднем через 11–13 лет у человека) [19–23, 26].

У эмбрионов мужского пола все, кроме прелептотены, стадии профазы I мейоза в гаметах начинают формироваться в половозрелый период [24]. У человека, как и у большинства видов млекопитающих, существует четкая разница по хронологии протекания стадий профазы I мейоза между эмбрионами и плодами женского и мужского пола [19, 26].

При половом созревании наступает диакинез, далее — метафаза I мейоза, анафаза I мейоза и телофаза I мейоза, что обеспечивает образование 2 клеток из 1 ППК (ооцита I или сперматоцита I). В сперматогенезе образующиеся сперматоциты 2 (вторичные) равноценны, в делении II мейоза из каждого из них формируются 2 равноценные сперматиды. При оогенезе из ооцита I формируются ооцит 2 (вторичный) и 1-е полярное тельце (с минимальным количеством цитоплазмы вследствие неравного деления цитоплазмы между ними). После короткой и практически не идентифицируемой профазы II мейоза наступает метафаза II мейоза, затем анафаза II и телофаза II, при которых ооцит делится на яйцеклетку и 2-е полярное тельце (1-е полярное тельце также может разделиться на 2 клетки крайне малого размера, нежизнеспособные).

Прохождение (формирование) гамет через многостадийную профазу I мейоза (прелептотена, лептотена, зиготена, пахитена, диплотена), затем диктиотену и диакинез, метафазу I, анафазу I, телофазу I, метафазу II, анафазу II и телофазу II могут быть нарушены вследствие аномалии конденсации хромосом, их конъюгации и кроссинговера, при нарушении формирования веретена деления или расхождения центриолей, центромера, при нарушении цитотомии в телофазе I или II, приводящем к формированию двух- или четырехъядерных сперматид. Нарушение этих стадий можно выявлять с помощью количественного исследования состава дифференцирующихся гамет, проходящих через вышеперечисленные стадии мейоза [13, 14, 18, 23, 24, 27].

Материалы и методы

Способ исследования митоза и мейоза мужских и женских половых клеток (у человека, представителей

разных видов животных и растений), анализ патологических форм митоза и мейоза проводят на экспериментальных животных, на аутопсийном материале (после смерти) или биоптатах яичка или коркового отдела яичника (получаемых строго по медицинским показаниям) [13–15, 22–25, 27–34], на гистологических препаратах (срезах биоптата) фрагментов гонад или готовят клеточную взвесь из ткани и раскапывают осадок (после центрифугирования) на предметные стекла, формируя на их поверхности расплавленные цельные (не на срезах) половые клетки. После их окрашивания переходят к выполнению количественного анализа митоза и/или мейоза гамет. Анализ митотически и мейотически делящихся гамет проводят с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 400$. Идентифицируют и подсчитывают на каждом 3-м срезе общее число клеток, среди них — число гамет в митозе или мейозе, а затем определяют долю делящихся митозом или мейозом половых клеток и из их числа — клетки на каждой стадии соответствующего деления (из общего числа отмеченных митозов или мейозов гамет), а также наличие патологических форм деления (в сумме и отмечая каждую форму патологии отдельно). Профаза в митозе гамет короткая, затем идут метафаза, анафаза и телофаза, приводящие к образованию 2 дочерних клеток. По окончании подсчета вычисляют каждую форму аномалии разных стадий митоза от общего числа всех половых клеток, от общего числа митозов гамет (в процентах от общего числа подсчитанных сперматогониев или оогониев и от общего числа их митозов). Сравнивая с контрольными индексами (полученными либо в наших исследованиях, либо по данным собственных исследований контрольного материала самими исполнителями), определяют пролиферативную (митотическую) активность мужских или женских половых клеток (сперматогониев или оогониев), а также различные формы их нарушения (учитывая все характеристики их патологических форм). Различают следующие показатели при анализе митоза и его патологии: профазу, метафазу, анафазу, телофазу. Патологические формы митоза: отставание одной/нескольких хромосом в метафазе, анафазе, телофазе, рассеивание хромосом, мосты хромосом в анафазе, телофазе, многополюсный митоз, звезды-метафазы, колхициновый митоз (хромосомы сгруппированы все вместе на 1 из 2 полюсов делящейся митозом клетки).

При анализе мейоза отмечают наличие/отсутствие блока предпахитенных стадий профазы I мейоза (прелептотены, лептотены, зиготены), процесс конъюгации гомологичных родительских хромосом (в зиготене, с помощью синаптонемного комплекса (СК)) и затем их расхождение (после кроссинговера, в пахитене и диплотене) профазы I мейоза по формированию и состоянию высокоспециализированной структуры СК (на световом или ультраструктурном уровнях) [15, 28–30].

Нередко происходит нарушение анафазы или телофазы I и II мейоза. Эти формы патологии деления гамет определяются по наличию двух- или четырехъядерных сперматоцитов 2 или сперматид. Наличие таких форм патологии в женских гаметах не выявляется, возможно только отмечать наличие двухъядерных ооцитов в периоде их созревания [19, 26]. Все эти формы патологии мейоза следует отмечать (каждую в отдельности) при проведении количественного подсчета (при анализе патологии мейоза) соотношения половых клеток на каждой стадии их развития. Результаты такого количественного анализа состояния многостадийного процесса мейоза в женских и мужских гаметах информативны при изучении действия повреждающих эндогенных и экзогенных факторов не только на гаметы человека, но и разных видов животных. После этого определяют долю делящихся в мейозе половых клеток (сперматоцитов или ооцитов первичных и вторичных) и из их числа — клетки на каждой стадии, фазе деления мейоза и из общего числа отмеченных в мейозе I и II гамет, а также наличие патологических форм деления (отдельно отмечая каждую форму патологии). В оогенезе идентифицируют также стадию диктиотены и кариосферу [19, 26].

По окончании подсчета от общего числа всех подсчитанных половых клеток на разных стадиях их развития и гамет на каждой конкретной стадии мейоза (в процентах от общего числа подсчитанных половых клеток) вычисляют каждую форму аномалии разных стадий мейоза. Сравнивая с контрольными индексами, определяют мейотическую активность мужских или женских половых клеток (сперматоцитов или ооцитов), индекс патологических форм мейоза (в сумме от всей патологии мейоза) и индекс каждой формы нарушения мейоза (учитывая все характеристики его патологических форм). При анализе мейоза и его патологии различают следующие показатели: профазы I мейоза (прелептотена, лептотена, зиготена, пахитена, диплотена, диктиотена), диакинез, метафазы I и II мейоза, анафазы I и II мейоза, телофазы I и II мейоза; патологические формы мейоза: отставание одной/нескольких хромосом или их рассеивание в метафазе, анафазе, телофазе I и II мейоза, мосты хромосом в анафазе, телофазе I и II мейоза, блок мейоза вследствие нарушения синтеза или формирования СК в зиготене и пахитене профазы I мейоза (до стадии метафазы), блок телофазы I и/или II мейоза с формированием двух- или четырехъядерных сперматид.

Результаты и обсуждение

Ранее исследовали состав незрелых половых клеток (НПК) и состояние стадий митоза и мейоза у 23 здоровых фертильных мужчин — доноров эякулята с кариотипом 46,XY (условно контрольные, 1-я группа). Полученная в результате анализа информация о состоянии митоза и мейоза гамет служит в качестве

контроля для человека (табл. 4) [14, 32]. Выполнен количественный анализ мейоза на препаратах НПК из эякулята 12 пациентов с бесплодием (см. табл. 4). У 5 из 12 выявлен блок прохождения НПК стадий прелептотены-лептотены-зиготены, у 2 — также блок в пахитене, у 1 — блок в диплотене профазы I мейоза. Повышения уровня нерасхождения гамет в анафазе и телофазе мейоза I и II не отмечено. У 2 мужчин с азооспермией (т. е. при отсутствии спермиев в эякуляте) в осадке эякулята были выявлены аномальные сперматозоиды: у одного — 52 спермия на 500 полей зрения, у другого — 506 на 1000 полей зрения). У обоих выявлен блок сперматогенеза на стадиях прелептотены-зиготены профазы I мейоза и повышение числа сперматид с не разошедшимися в анафазе-телофазе мейоза I и мейоза II клетками и гамет в дегенерации. У 4 мужчин на фоне практически сниженного числа НПК обнаружено повышение числа сперматоцитов 2 и сперматид, у 1 — снижение, что свидетельствует о патологии прохождения гамет через анафазу и телофазу I и II мейоза и может стать одной из причин азоо- или олигозооспермии.

При выборе критериев оценки (тестирования) мейоза проводили анализ состава по стадиям развития НПК из эякулята пациентов с патозооспермией разной этиологии; 1-ю группу (контрольную) составили доноры эякулята; во 2-ю был включен 31 мужчина — ликвидатор аварии на Чернобыльской атомной энергостанции; в 3-ю — 14 мужчин с хроническим простатитом; в 4-ю — 10 мужчин, переболевших гонореей; в 5-ю — 13 мужчин с варикоцеле. Всем пациентам было выполнено цитогенетическое исследование хромосом по лимфоцитам периферической крови [32, 33]. Все обследованные имели кариотип 46,XY, без патологии. Наибольшее (по сравнению с группой контроля) повышение числа сперматоцитов в метафазе I и II мейоза зарегистрировано в 4-й группе. У них также выявлено максимальное число (около 30 % по сравнению с 23 % у мужчин 1-й группы) не разошедшихся сперматоцитов 1 в мейозе I и сперматоцитов 2 — в мейозе II (что свидетельствует о частичном блоке на стадиях анафазы/телофазы), а также значительное повышение числа неидентифицируемых гамет (т. е. НПК в дегенерации > 13 %) (табл. 5). У мужчин 2-й группы обнаружено нарастание числа НПК на стадиях предпахитены (т. е. блок в прелептотене, лептотене и зиготене профазы I мейоза). У пациентов 5-й группы отмечено повышение числа сперматоцитов в метафазе мейоза I и мейоза II. Изменения по другим показателям статистически не значимы (см. табл. 5) [14, 32].

Полученные данные свидетельствуют о возможности количественной оценки нарушения определенных стадий мейоза при дифференцировке гамет, что позволяет выявить патогенез их аномалий и может стать основой для разработки профилактики определенных форм патологии мейоза.

Таблица 4. Количественные данные по соотношению незрелых половых клеток на разных стадиях мейоза из эякулята обследованных мужчин (доля в процентах от числа подсчитанных половых клеток)

Группа доноров (n = 23) и пациенты (№ 1-12)	Число анализируемых незрелых половых клеток (НПК) на 1 пациента	Сперматциты в профазе I мейоза, %			Сперматциты в метафазе I, II мейоза, %	Сперматциты и сперматиды, %	Не разошедшиеся в M1 и M2 гаметы, %	Неидентифицируемые НПК, %
		Предпахитена	Пахитена	Диплотена				
№ пациента	345,53 ± 24,07 %	0,66 ± 0,16 %	0,45 ± 0,10%	1,11 ± 0,26%	0,04 ± 0,02 %	91,99 ± 0,89 %	22,98 ± 2,65 %	5,85 ± 0,85 %
1	89	1	0	0	0	85	24	14
2	49	0	0	0	0	96	21	4
3	24	0	0	0	0	100	4	0
4	28	0	0	0	0	100	0	0
5	152	0	0	0	0	95	17	5
6	74	2,7	1,3	0	0	96	2,5	0
7	113	2	0	0	0	92,6	13	5,4
8	229	6	0,9	1,7	0	83	16	8,4
9	114	3,4	0,8	0,8	0	81	3	14
10	80	2,5	1,3	1,3	0	92,5	7	2,4
11	177	1	0	0,6	0	92	31	6,4
12	25	0	0	0	0	68	29	32

Таблица 5. Состояние мейоза в незрелых половых клетках из эякулята обследованных мужчин (доля в процентах от числа подсчитанных половых клеток определенных стадий)

Группы пациентов	Число анализируемых незрелых половых клеток (НПК) на 1 пациента	Количественные данные по составу незрелых половых клеток различных стадий развития в эякуляте обследованных пациентов						
		Сперматциты в профазе I мейоза			Сперматциты в метафазе I, II мейоза, %	Сперматциты и сперматиды, %	Неразошедшиеся в M1 и M2 гаметы, %	Неидентифицируемые НПК, %
		Предпахитена, %	Пахитена, %	Диплотена, %				
1-я (n = 23) – контрольная	345,53 ± 24,07	0,66 ± 0,16	0,45 ± 0,10	1,11 ± 0,26	0,04 ± 0,02	91,99 ± 0,89	22,98 ± 2,65	5,85 ± 0,85
2-я (n = 27) – ЛПА ЧАЭС	331,07 ± 21,35	1,18 ± 0,42	0,10 ± 0,03	1,58 ± 0,37	0,01 ± 0,01	87,06 ± 1,93	22,60 ± 3,65	5,72 ± 0,99
3-я (n = 14) – простатит	258,57 ± 42,09	0,93 ± 0,42	0,55 ± 0,27	1,28 ± 0,39	0,10 ± 0,07	88,35 ± 2,83	24,70 ± 4,38	8,22 ± 2,19
4-я (n = 10) – гонорея	307,80 ± 47,76	0,19 ± 0,11	0,20 ± 0,11	1,24 ± 0,48	0,61 ± 0,42	85,44 ± 4,84	29,56 ± 6,74	13,67 ± 5,66
5-я (n = 13) – варикоцеле	232,38 ± 29,31	0,41 ± 0,14	0,28 ± 0,25	1,47 ± 1,30	0,21 ± 0,16	91,59 ± 3,15	24,86 ± 4,30	6,66 ± 2,10

Выводы

Количественный метод анализа состава незрелых половых клеток в митозе и мейозе (из эякулята, яичников эмбрионов и плодов млекопитающих, биоптатов гонад или их фрагментов от секционного материала) необходимо внедрять в практику диагностики андро-

логических и гинекологических клиник, при обследовании пациентов, в экспериментальных исследованиях. Разработку количественного анализа состояния митоза и мейоза начинали на экспериментальных животных и гонадах плодов от спонтанных или медицинских аборт [1–10, 13, 15–17].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Семенова-Тян-Шанская А.Г. Происхождение, дифференцировка и миграция гонцитов у ранних зародышей человека. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1973, 20 с. [Semenova-Tyan-Shanskaya A.G. Origin, differentiation and migration of the gonocytes from early human embryos. Abstract of the thesis ... of the candidate of biological. Leningrad, 1973. (In Russ.)].
2. Baker T.G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963;158:417–33.
3. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17(2):121–55.
4. Алов И.А. Очерки физиологии митотического деления клеток. М.: Медицина, 1964. 214 с. [Alov I.A. Essays on the physiology of mitotic cell division. Moscow: Meditsina, 1964. 214 p. (In Russ.)].
5. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 245 с. [Alov I.A. Cytophysiology and pathology of mitosis. Moscow: Meditsina, 1972. 245 p. (In Russ.)].
6. Казанцева И.А., Курило Л.Ф. Трехгрупповые метафазы в многослойном плоском эпителии шейки матки. Материалы VI конференции по регенерации и клеточному делению. М., 1971. С. 84–5. [Kazantseva I.A., Kurilo L.F. Trehgrudaya metaphase in the stratified squamous epithelium of the cervix. Proceedings of the VI Conference on regeneration and cell division. Moscow, 1971. Pp. 84–5. (In Russ.)].
7. Казанцева И.А., Курило Л.Ф. Изменение митотического режима при малигнизации эпителия шейки матки. Вестник АМН СССР 1971;(10):60–3. [Kazantseva I.A., Kurilo L.F. Change in mitotic mode by malignancy of the cervical epithelium. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of Medical Sciences of the USSR* 1971;(10):60–3. (In Russ.)].
8. Королев Ю.Н., Курило Л.Ф., Никулина Л.А. и др. Влияние сульфатной питьевой минеральной воды в сочетании с лазерным и магнитно-лазерным излучением на частоту возникновения патологических митозов в сперматогониях облученных крыс и их потомства. Вопросы курортологии физиотерапии и лечебной физической культуры 2006;(5):23–5. [Korolev Yu.N., Kurilo L.F., Nikulina L.A. et al. Effect of sulfate mineral water in combination with laser and magnetic-laser radiation on the frequency of pathological mitosis in spermatogonia irradiated rats and their offspring. *Voprosy kurortologii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury = Questions of Balneology Physiotherapy and Medical Physical Culture* 2006;(5):23–5. (In Russ.)].
9. Курило Л.Ф. Изучение механизмов возникновения трехгрупповых метафаз. Вестник АМН СССР 1969;(9):62–6. [Kurilo L.F. Study of the mechanisms of occurrence trehgrudaya metaphases. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of Medical Sciences of the USSR* 1969;(9):62–6. (In Russ.)].
10. Курило Л.Ф. О некоторых механизмах индукции патологических митозов эстрадиолом. Цитология 1969;11(12):1576–80. [Kurilo L.F. About some of the mechanisms of induction of pathological mitoses estradiol. *Tsitologiya = Cytology* 1969;11(12):1576–80. (In Russ.)].
11. Курило Л.Ф., Алов И.А., Казанцева И.А. Нарушение клеточного деления под влиянием эстрадиола in vitro и их возможная роль в морфогенезе рака шейки матки. Тезисы докладов VII Международного конгресса акушеров-гинекологов. М.: 1973. [Kurilo L.F., Alov I.A., Kazantseva I.A. The violation of cell division under the influence of estradiol in vitro and their possible role in the morphogenesis of cervical cancer. Abstracts of the VII International Congress of obstetricians and gynecologists. Moscow, 1973. (In Russ.)].
12. Курило Л.Ф. Влияние колхицина на митотический режим фибробластоподобных клеток китайского хомячка линии 237. Бюллетень экспериментальной биологии 1974;77(3):95–8. [Kurilo L.F. The effect of colchicine on mitotic mode fibroblastoid of Chinese hamster cells line 237. *Bulleten' eksperimental'noy biologii = Bulletin of Experimental Biology* 1974;77(3):95–8. (In Russ.)].
13. Курило Л.Ф. Гаметогенез человека: выявление и анализ аномалий хромосом и гамет в целом, тестирование гаметотоксического эффекта повреждающих факторов. Лабораторное дело 1989;(10):4–8. [Kurilo L.F. Gametogenesis person: identification and analysis of abnormalities of chromosomes and gametes in General, testing gamatologicheskogo effect of damaging factors. *Laboratornoe delo = Laboratory Work* 1989;(10):4–8. (In Russ.)].
14. Курило Л.Ф. Методы тестирования и количественные критерии оценки оогенеза и сперматогенеза при повреждающих действиях. Материалы конференции «Медико-психологические последствия аварии на ЧАЭС и пути их преодоления», 18–20 апреля 1998 г. СПб., 1998. [Kurilo L.F. The test methods and quantitative evaluation criteria of oogenesis and spermatogenesis in damaging actions. Proceedings of the conference «The medical-psychological consequences of the Chernobyl accident and ways of overcoming them», April 18–20, 1998. Saint Petersburg, 1998. (In Russ.)].
15. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синнаптонемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. [Bogdanov Yu.F., Kolomiets O.L. Synaptonemal complex — an indicator of meiosis and variability of chromosomes. Moscow: Tovarichestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2007. (In Russ.)].
16. Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. М.: Медицина, 1979. [Sanotskiy I.V., Fomenko V.N. Long-term effects of chemical compounds on the body. Moscow, Meditsina, 1979. (In Russ.)].
17. Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive functions. Eds. by: V.B. Vouk, P.J. Sheehan, A.C. Upton et al. 1987.
18. Курило Л.Ф. Проблемы преемственности профилактики репродуктивного здоровья. В сб.: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 12. Новосибирск: Альфа-Виста Н, 2008. С. 42–63. [Kurilo L.F. Problems preconceptional prevention reproductive health. In proceedings of: Molecular-biological technology in medical practice. Ed. by A.B. Maslennikov. Vol. 12. Novosibirsk, Alfa-Vista N, 2008. Pp. 42–63. (In Russ.)].
19. Курило Л.Ф. Морфо-функциональные характеристики оогенеза млекопитающих и человека. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1985. [Kurilo L.F. Morpho-functional features of oogenesis mammals and humans. Abstract of the thesis ... of the doctor of biological. Moscow, 1973. (In Russ.)].
20. Игнатьева Е.Л., Курило Л.Ф. Гаметотоксическое действие окситетрациклина на ранний антенатальный оогенез мышей в экспериментах in vivo и in vitro. Фармакология и токсикология 1984;(5):75–7. [Ignat'eva E. L., Kurilo L.F. Gematologiya the effect of oxytetracycline on early prenatal oogenesis of mice in experiments in vivo and in vitro. *Farmakologiya i gematologiya = Pharmacology and Toxicology* 1984;(5):75–7. (In Russ.)].
21. Игнатьева Е.Л., Курило Л.Ф. Антенатальный оогенез мышей и его экспериментальная модификация. Онтогенез 1984;15(2):206–11. [Ignat'eva E. L., Kurilo L.F. Prenatal oogenesis of mice and its experimental modification. *Ontogenez = Ontogenesis* 1984;15(2):206–11. (In Russ.)].
22. Курило Л.Ф., Игнатьева Е.Л., Хилькевич Л.В., Леонов Б.В. Нарушение пролиферации оогониев при введении в культуру яичника плодов человека

- окситетрациклина и 17-β-эстрадиола. *Акушерство и гинекология* 1985;(4):53–5. [Kurilo L.F., Ignat'eva E. L., Khil'kevich L. V., Leonov B.V. A violation of the proliferation of oögonia in the introduction to the culture of human fetal ovary oxytetracycline and 17-β-estradiol. *Akusherstvo i ginekologiya* = *Obstetrics and Gynecology* 1985;(4):53–5. (In Russ.)].
23. Курило Л.Ф., Хилькевич Л.В., Дубинская В.П., Лил'п И.Г. Эффект антенатального воздействия ТиоТЭФ на сперматогенез половозрелых мышей линий 101/Н и СВА. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1992;114(9):307–8. [Kurilo L.F., Khil'kevich L. V., Dubinskiy, V. P., Lil'p I.G. The effect of prenatal exposure Tiotef on spermatogenesis of sexually Mature mice lines 101/H and CBA. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1992;114(9):307–8. (In Russ.)].
24. Хилькевич Л.В., Курило Л.Ф. Кинетика популяции мужских половых клеток человека в антенатальном периоде онтогенеза. *Онтогенез* 1992;23(5):506–10. [Khil'kevich L. V., Kurilo L.F. Kinetics of populations of male germ cells in the antenatal period of ontogenesis. *Ontogenez* = *Ontogenesis* 1992;23(5):506–10. (In Russ.)].
25. Курило Л.Ф. Система тестирования факторов гаметотоксического действия. Доклады 1-го Международного симпозиума ЕЕРО (Европейской организации по охране окружающей среды), 12–18 сентября 1994 г. М., 1994. [Kurilo L.F. Testing system factors gamatologicheskogo action. *Reports of the 1st International Symposium EERO (European Organization for Environmental Protection)*, September 12–18, 1994. Moscow, 1994. (In Russ.)].
26. Курило Л.Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих. М.: Lambert Acad Publ, 2012. [Kurilo L.F. Regularities of baryogenesis and oogenesis mammals. Moscow: Lambert Acad Publ, 2012. (In Russ.)].
27. Kurilo L.F. Oogenesis in antenatal development in man. *Human Genet* 1981;57(1):86–92.
28. Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс как индикатор хромосомной изменчивости. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1998. [Kolomiets O.L. Synaptonemal complex as an indicator of chromosomal variability. Abstract of the thesis ... of the doctor of biological. Moscow, 1998. (In Russ.)].
29. Коломиец О.Л., Сухачева Т.В., Курило Л.Ф. и др. Анализ мутагенного и токсического действия лекарственных препаратов на хромосомы мужских половых клеток. *Андрология и генитальная хирургия* 2002;(3):17. [Kolomiets O.L., Sukhacheva T.V., Kurilo L. F. et al. Analysis of the mutagenic and toxic action of drugs on the chromosomes of male germ cells. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* = *Andrology and Genital Surgery* 2002;(3):17. (In Russ.)].
30. Коломиец О.Л., Абудуев Н.К., Мазуров Т.Ф. и др. Повреждающее действие антибиотиков на структуру синаптонемных комплексов мейотических хромосом мыши. *Генетика* 2001;37(2):197–200. [Kolomiets O.L., Abuduev N.K., Mazurov T.F. et al. Damaging effect of antibiotics on the structure of synaptonemal complexes of the meiotic chromosomes of the mouse. *Genetika* = *Genetics* 2001;37(2):197–200. (In Russ.)].
31. Kurilo L.F., Leonov B.V. Human oogenesis and short-term test valuation of damaging factors influence over female germ cells. In: *Working Paper for SGOMSEC 4: Predictive Value of Short-Toxicity Tests*. Ottawa, 1984.
32. Курило Л.Ф., Дубинская В.П., Остроумова Т.В. и др. Оценка сперматогенеза по незрелым половым клеткам эякулята. *Проблемы репродукции* 1995;1(3):33–8. [Kurilo L.F., Dubinskiy V.P., Ostroumova T.V. et al. Evaluation of spermatogenesis in the immature germ cells in ejaculate. *Problemy Reproduktsii* = *Problems of Reproduction* 1995;1(3):33–8. (In Russ.)].
33. Курило Л.Ф., Чеботарев А.Н., Шилейко Л.В. и др. Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных стадиях их дифференцировки в биоптате яичка и эякуляте у пациентов с азоо- и олигозооспермией. *Проблемы репродукции* 1997;3(1):80–4. [Kurilo L.F., Chebotarev A.N., Shileyko L.V. et al. Comparative analysis of the ratio of immature germ cells at different stages of their differentiation in the biopsy of the testis and ejaculate in patients with azoo- and oligozoospermia. *Problemy reproduktsii* = *Problems of Reproduction* 1997;3(1):80–4. (In Russ.)].
34. Порядок оказания медицинской помощи по профилю «Акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» от 01.11.2012 № 572н. Приложение № 20. [The order of rendering of medical aid according to the specialty “Obstetrics and gynecology (with the exception of the use of assisted reproductive technologies)” from 01.11.2012 No 572n. Supplement No 20. (In Russ.)].