

УДК 616.14.008

ІНФОРМАЦІЙНО-СТАТИСТИЧНІ ОЦІНКИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ FISH-МЕТОДУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ «ПРИХОВАНОГО» МОЗАЇЦИЗМУ СТАТЕВИХ ХРОМОСОМ СЕРЕД БЕЗПЛІДНИХ ПОДРУЖНИХ ПАР

С. В. Денисенко

Клініка проблем планування сім'ї МОЗ України

Вивчена можливість використання третього і четвертого статистичних моментів для виявлення «прихованого» мозаїцизму. Показано значення використання FISH-методу на інтерфазних клітинах із застосуванням центромерних ДНК-зондів на хромосоми X і Y для виявлення «прихованого» мозаїцизму статевих хромосом (гоносом) серед подружніх пар.

Ключові слова: інформаційно-статистичні оцінки, FISH-метод, коефіцієнт асиметрії, коефіцієнт ексцесу, «прихований» мозаїцизм.

ИНФОРМАЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ПРИМЕНЕНИЯ FISH-МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ "СКРЫТОГО" МОЗАИЦИЗМА ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ СРЕДИ БЕСПЛОДНЫХ СУПРУЖЕСКИХ ПАР

С. В. Денисенко

Клиника проблем планирования семьи МЗ Украины

Изучена возможность использования третьего и четвертого статистических моментов для выявления "скрытого" мозаицизма. Показано значение использования FISH-метода на интерфазных клетках с применением центромерных ДНК-зондов на хромосомы X и Y для выявления "скрытого" мозаицизма половых хромосом (гоносом) среди супружеских пар.

Ключевые слова: информационно-статистические оценки, FISH-метод, коэффициент асимметрии, коэффициент эксцесса, "скрытый" мозаицизм.

APPLICATION OF FISH-METHOD IN IDENTIFICATION OF CRYPTIC MOSAICISM INVOLVING SEX CHROMOSOMES IN COUPLES WITH REPRODUCTIVE FAILURE

S. V. Denysenko

Clinic of Problems of Family Planning of Ministry of Public Health of Ukraine

The application of FISH-method on interphase cells with centromeric probes for chromosomes X and Y is described as used together with the traditional cytogenetic methods for the screening minor sex aneuploid cell lines among the couples with reproductive problems.

Key words: informatively-statistical estimations, FISH-method, coefficient of asymmetry, coefficient of excess, "hidden" mosaicism.

Вступ. Сьогодні молекулярно-цитогенетичний метод з використанням різних типів ДНК-зондів успішно застосовують для виявлення та ідентифікації кількісної та структурної хромосомної патології. У цьому дослідженні зроблено спробу оцінити значення молекулярно-цитогенетичних методів у вивченні «прихованого» мозаїцизму у безплідних подружніх пар і порівняти з подібними випадками, описаними в літературі. Ми продемонстрували ефективність застосування FISH-ме-

тоду на інтерфазних клітинах з метою виявлення мінімального мозаїцизму (< 10 %) статевих хромосом (гоносом) у безплідних подружніх пар.

Об'єкт та методи дослідження. Ретроспективний аналіз був проведений для визначення питомої ваги мозаїцизму гоносом серед безплідних подружніх пар та оцінки інформативності РКН-методу у виявленні та визначенні співвідношення клону (-ів) клітин при мозаїцизмі. Цитогенетичний аналіз проводили за загальноп-

© С. В. Денисенко

рийнятою методикою [1]. Препарати прометафазних хромосом були отримані з культури лімфоцитів периферійної крові за допомогою інкубації культури з метотрексатом 10-12 годин і додаванням 5 бром-дезоксіуридину за 5 годин до початку фіксації. Препарати хромосом фарбували диференційно GTG-методом, для дослідження поліморфізму гетерохроматинових районів використовували QFQ-і CBG-методи. Хромосомний аналіз проводився за допомогою мікроскопа "Olympus BX60" при збільшенні $\times 1000$. Для кожного пацієнта аналізували по 16 метафаз, при виявленні 1 клітини з втраченою або додатковою хромосоною X кількість аналізованих метафаз збільшували до 25.

Молекулярно-цитогенетичний аналіз проводили за допомогою флуоресцентної гібридизації клонованих послідовностей ДНК на інтерфазних ядрах в умовах *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization - FISH) згідно з протоколом, рекомендованим виробником ДНК-зондів (Vysis, Abbott Laboratories, IL US A). У роботі були використані ДНК-зонди на центромірні ділянки хромосом X і Y (CEP X Spectrum Green і CEP Y Spectrum Orange). Інтерфазні ядра фарбували DAPI II (Vysis, Abbott Laboratories, IL US A). Для кожного випадку було проаналізовано по 500 інтерфазних ядер хорошої якості, без накладень. Результати молекулярної гібридизації оцінювали, визначаючи наявність і кількість сигналів в інтерфазних клітинах. Аналіз проводився за допомогою мікроскопа "Olympus BX60", укомплектованого лампою HBOx100 та набором фільтрів DAPI/Rhodamine/FITC.

Для аналізу інформативності показників молекулярно-цитогенетичного методу використовували центральний момент третього та четвертого порядків. Основою частоти використання було вивчення асиметрії та показників ексцесу розподілу. Як відомо, функція щільності ймовірності $p(x)$ не завжди симетрична, як при гаусівському розподілі. Наприклад, необхідно охарактеризувати форму кривої. По один бік моди знаходиться більш протяжна ділянка кривої, а по другий - більш коротка. Якщо більш протяжна ділянка лежить праворуч від величини математичного очікування $M(x)$, то центральний момент третього порядку буде позитивним. Асиметрія в цьому випадку рахується позитивно. У протилежному випадку вона негативна. Але оскільки у центрального моменту третього порядку є похибка (він має свою фізичну розмірність), використовували безрозмірну характеристику - показники асиметрії:

$$A_k = \frac{m_3(x)}{\sigma_x^3}$$

Застосовували також показники ексцесу

$$e = m \frac{M}{\sigma_x^4} - 3.$$

У низці випадків використовували поняття моди та амплітуди моди, які трактували в розумінні максимуму самої ймовірності.

Постановка завдання. Відомо, що мозаїцизм за тією чи іншою хромосоною може обумовлювати у людини аномалії розвитку. У носіїв мозаїчного клону клінічна картина більш стерта, ніж у індивідів з повною формою анеуплоїдії [2]. Відомі випадки мозаїцизму за хромосомами 18 або 21 у фенотипічно нормальних батьків дітей з анеуплоїдією (трисомією за хромосоною 18 або 21) [3, 4].

Отримані результати. Проведено цитогенетичний аналіз 45 подружнім парам. Середній вік подружніх пар склав для жінок 31,4 року, а для чоловіків - 34,7 року. Виявлено 6 чоловіків та 7 жінок з мозаїцизмом гоносом. Цитогенетичний аналіз дозволив виявити 1-2 клітини з анеуплоїдією гоносом. У таблицях 1 і 2 представлені результати цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень подружніх пар.

В результаті цитогенетичного дослідження подружніх пар нами було виявлено випадки наявності клону клітин з дисомією хромосоми X. У чотирьох чоловіків була виявлена одна метафаза з аномальною кількістю хромосоми X з 25 проаналізованих клітин, ще один випадок стосувався іншої гоносоми - У Крім мозаїцизму хромосоми У, у пацієнта у всіх клітинах була виявлена перичентрична інверсія хромосоми 2 (випадок М4, табл. 1). У шостому випадку була виявлена тетрасомія хромосоми У в одній клітині з 25 проаналізованих (випадок М5, табл. 1). Отже, у шести випадках відсоткове співвідношення аномального клону клітин до проаналізованих клітин становило 4%.

Для всіх випадків застосовано Б[^]Н-метод. В ході молекулярно-цитогенетичного аналізу ставили за мету встановлення наявності/відсутності аномального клону клітин з анеуплоїдією хромосом X або У, а також встановлення співвідношення нормального й аномального (-их) клонів в кожному конкретному випадку. Молекулярно-цитогенетичне дослідження підтвердило наявність клону клітин з дисомією хромосоми X в трьох з чотирьох випадків, також наявність клону клітин з дисомією хромосоми У в одному випадку (випадок М4, табл. 1), а в разі випадку М5 дозволило виявити наявність не одного, а двох аномальних клонів з дисомією та тетрасомією хромосоми У. Серед виявлених цитогенетичним аналізом чотирьох випадків із ди-

сомією хромосоми X у обстежених чоловіків молекулярно-цитогенетичний аналіз не підтвердив наявності клону клітин з дисомією хромосоми X у разі М6 - у всіх проаналізованих п'ятистах інтерфазних ядрах був присутній лише один сигнал, що маркірує хромосому X. Таким чином, каріотип у даному випадку був визначений як 46,XY.

Серед обстежених жінок цитогенетичний аналіз виявив 7 випадків наявності клону клітин з моносомією (трисомією/тетрасомією) хромосоми X, при цьому частка клітин з моносомією хромосоми X становила 5 % (випадки Б2, Б3, Б4, Б6) і 8 % у випадку (табл. 2). У випадку Б7 була виявлена одна клітина з каріотипом 47,XXX з 25-ти проаналізованих. Мо-

Таблиця 1. Результати цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень випадків мозаїцизму за гоносомами серед обстежених чоловіків

№ з/п	Випадки	Вік, роки	Результат стандартного цитогенетичного дослідження	Результат молекулярно-цитогенетичного дослідження
1	(M1)	43	47,XXY[1]/46,XY[24]	47,XXY.nuc ishXcen (DXZ1x2) [85]/ 46,XY.nuc ishXcen (DXZx1)[415]
2	(M2)	38	47,XXY[1]/46,XY[24]	47,XXY.nuc ishXcen (DXZ1x2) [108]/ 46,XY.nuc ishXcen (DXZx1)[392]
3	(M3)	39	47,XXY[1]/46,XY[24]	47,XXY.nuc ishXcen (DXZ1x2) [92]/ 46,XY.nuc ishXcen (DXZx1)[408]
4	(M4)	27	47,XY,inv(2)(p11.2q13) [1]/46,XY,inv(2) (p11.2q13)[24]	47,XY,inv(2)(p11.2q13). nuc ishYcen (DYZ1x2) [127]/ 46,XY,inv(2) (p11.2q13). nuc ishYcen (DYZ1x1) [374]
5	(M5)	43	49,XYYYYY[1]/46,XY[24]	47,XY.nuc ishYcen (DYZ1x2) [48]/49,XYYYYY. nuc ishYcen (DYZ1x4) [27]/ 46,XY.nuc ishYcen (DXYx1)[425]
6	(M6)	28	47,XXY[1]/46,XY[24]	46,XY.nuc ishXcen (DXZx1)[600]

Таблиця 2. Результати цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень випадків мозаїцизму гоносом серед обстежених жінок

№ з/п	Випадки	Вік, роки	Результат стандартного цитогенетичного дослідження	Результат молекулярно-цитогенетичного дослідження
1	(F1)	39	45,X[2]/46,XX[23]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [82]/ 46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[418]
2	(F2)	33	45,X[1]/46,XX[24]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [122]/ 46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[378]
3	(F3)	38	45,X[1]/46,XX[24]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [95]/ 46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[405]
4	(F4)	30	45,X[1]/46,XX[24]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [88]/ 46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[412]
5	(F5)	43	45,X[2]/48,XXXX [1]/46,XX[23]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [87]/ 47,XXX.nuc ishXcen (DXZx3)[23]/ 48,XXXX. nuc ishXcen(DXZx4)[13]/46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[377]
6	(F6)	37	45,X[1]/46,XX[24]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [45]/ 47,XXX.nuc ishXcen (DXZx3)[18]/46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[437]
7	(F7)	27	47,XXX[1]/46,XX[24]	45,X.nuc ishXcen (DXZ1x1) [120]/ 47,XXX.nuc ishXcen (DXZx3)[43]/ 48,XXXX. nuc ishXcen(DXZx4)[25]/46,XX.nuc ishXcen (DXZx2)[312]

лекулярно-цитогенетичний аналіз підтвердив наявність клону клітин з анеуплоїдією хромосоми X у всіх випадках, а також виявив додаткові клони клітин з аномальною кількістю хромосоми X в трьох випадках F5, F6, F7 (табл. 2). Так, у випадку F5 за допомогою FISH-методу було виявлено не три, а чотири клони клітин. Відповідно, каріотип в даному випадку був визначений як: 45,X [87]/47,XXX[23]/48,XXXX [13]/46, XX[377]. У випадку F6 молекулярно-цитогенетичне дослідження показало також наявність ще одного клону клітин, не виявленого в результаті цитогенетичного аналізу. Каріотип в даному випадку був визначений як: 45,X[45]/47,XXX[18]/46,XX [437]. У випадку F7 цитогенетичний аналіз показав наявність трисомії X в одній клітині з 25-ти. FISH метод виявив ще два клони клітин - з моносомією і тетрасомією хромосоми X.

Отже, при проведенні молекулярно-цитогенетичного дослідження за допомогою FISH-методу було підтверджено наявність мозаїцизму гоносом в 12-ти випадках, в одному випадку (M6) аномальний клон був відсутній. З дванадцяти підтверджених випадків в чотирьох було виявлено наявність додаткового аномального клону (випадок M5, табл. 1 і випадки F5, F6, F7 табл. 2).

Відсоткове співвідношення аномальних і нормальних клонів для кожного випадку представлені в табл. 3. Якщо при цитогенетичному аналізі відсоток аномального клону становив 4-5 %, то після проведення молекулярно-цитогенетичного аналізу клон з дисомією хромосоми X у чоловіків склав 17-21,6 %. Серед жінок, що мали тільки один аномальний клон - з моносомією хромосоми X, відсоток клітин склав від 16,4 до 24,4 %.

Таблиця 3. Співвідношення мозаїчних клонів після проведення інтрафазного FISH-аналізу

Випадки	Кількість сигналів (%)								Кількість проаналізованих клітин
	X	XX	XXX	XXXX	Y	YY	YYY	YYYY	
M1	415 (83%)	85 (17%)							500
M2	392 (78%)	108 (21%)							500
M3	408 (81%)	92 (18%)							500
M4					374 (74%)	126 (25%)			500
M5					425 (85%)	48 (9%)		27 (5%)	500
F1	82 (16%)	418 (83%)							500
F2	122 (24%)	378 (75%)							500
F3	95 (19%)	405 (81%)							500
F4	88 (17%)	412 (82%)							500
F5	87 (17%)	377 (75%)	23 (4%)	13 (2%)					500
F6	45 (9%)	437 (87%)	18 (3%)						500
F7	120 (24%)	312 (62%)	43 (8%)	25 (5%)					500

Обговорення результатів. Накопичені до цього часу дані з цитогенетичного дослідження безплідних подружніх пар демонструють підвищену частоту хромосомних аномалій, серед яких значну частину складають аберації гоносом - структурні та кількісні аномалії [5-10]. Зв'язок між чоловічим безпліддям, обумовленим азооспермією або важкою олігозоос-

пермією і аномальним каріотипом, встановлено [11-13]. У той же час останні дані свідчать про несподівану для дослідників підвищену частоту поширення хромосомних аномалій у жінок [14, 15]. Так, проведене обстеження подружніх пар, які звернулися у зв'язку з безпліддям, виявило хромосомні аномалії серед чоловіків в 4,5 % випадків. При цьому частота

кількісних і структурних аномалій статевих хромосом становила 1,5 %. Серед обстежених жінок хромосомні аномалії були виявлені в 9,8 % випадків, причому аномалії, пов'язані зі статевими хромосомами, були виявлені в 7,5 % випадків. Показник імплантації ембріона для жінок з аутосомною перебудовою, становив 16,3 %, для жінок з мозаїцизмом хромосоми X - 9,4 %, а для чоловіків - 23,1 % та 3,8 %, відповідно. Попередні результати показали низький відсоток імплантації ембріона у жінок з мінімальним мозаїцизмом хромосоми X [15].

Серед виявлених хромосомних аномалій значну частину займають аномалії, пов'язані з мозаїцизмом гоносом [16, 17]. Соматичний мозаїцизм - наявність в організмі генетично різних клітинних популяцій - може зумовлювати внутрішньоутробну загибель плода, внутрішньоутробну затримку розвитку, народження дитини з хромосомною патологією або з розумовою відсталістю, а також спонтанні аборти або безпліддя у подружніх пар [18, 19].

Мозаїцизм з клоном клітин, який містить аномальну кількість гоносом, найчастіше зустрічається у носіїв синдрому Шерешевського-Тернера, синдрому Клайнфельтера, при синдромі трисомії X. Так, синдром Шерешевського-Тернера в 40-50 % випадків обумовлений моносомією хромосоми X, решта 50-60 % випадків супроводжуються або структурними перебудовами хромосом X або Y, або мозаїцизмом [16]. Серед пацієнтів з синдромом Клайнфельтера мозаїчний клон з дисомією хромосоми X виявляється в 15-20 % (як варіанти мозаїцизму зустрічаються каріотипи ХУ/ХХУ і ХХ/ХХУ) [16, 20, 21]. Для чоловіків з мозаїчною формою синдрому Клайнфельтера слід враховувати результати цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного аналізів, оскільки у них спостерігається анеуплоїдія гоносом і в сперматозоїдах (частота становить 1,23-3,45 %) [22-24]. Відповідно, для таких пацієнтів ризик народження дитини з анеуплоїдією за аутосомою або гоносомою підвищений [25, 26]. Полісомія Y зустрічається серед чоловіків найчастіше у вигляді дисомії (каріотип 47,ХУУ з частотою 0,75-1 на 1000 новонароджених хлопчиків) [16]. Дисомія Y описана як повна, так і мозаїчна - з наступними клітинними лініями: 45,Х; 46,ХУ; 47,ХХУ; 48,ХХУУ [16, 27].

Одним з видів мозаїцизму є мінімальний, або прихований, мозаїцизм [8, 15]. Вплив такого мінімального мозаїцизму на репродуктивну функцію подружжя в даний час дискутується [7, 8, 10, 14, 28]. Так, 81% жінок вважають, що подібні знахідки мінімального

мозаїцизму часто притаманні жінкам віком > 35 років (за даними інших авторів - > 45-60 років) і демонструють соматичний мозаїцизм [9]. В більшості випадків виявлення однієї клітини з аномальною кількістю хромосоми X або Y при проведенні стандартного цитогенетичного аналізу сприймається цитогенетиками як артефакт і не констатується в цитогенетичному висновку. Літературні джерела показують велику розбіжність не тільки у визначенні явища мінімального мозаїцизму, але і в методологічному підході (йдеться про кількість аналізованих метафаз для встановлення факту мозаїцизму). Так, за рекомендаціями Peschka et al., 1999, при виявленні 1 клітини з 20 проаналізованих слід продовжити аналіз до 50-100 метафаз [8]. Інші автори збільшують аналіз до 30 клітин [10].

Використання FISH-методу дозволяє більш точно встановити наявність/відсутність клону (або клонів) клітин з аномальною кількістю хромосоми X або Y, а також виявити істинне співвідношення клонів клітин. Ще одним підтвердженням можливості мозаїцизму є визначення коефіцієнтів асиметрії і ексесу. FISH-метод інформативний як на про- і метафазних препаратах, так і при аналізі клітин, що не діляться. Метод гібридизації *in situ* на інтерфазних клітинах широко використовується в пренатальній діагностиці для швидкого виявлення найбільш поширених хромосомних анеуплоїдій - трисомії хромосом 13, 18, 21. Останнім часом визначення співвідношення клонів клітин при мозаїчних формах синдромів Шерешевського-Тернера, Клайнфельтера також ґрунтується виключно на аналізі кількості сигналів в інтерфазних клітинах.

Висновки. 1. Прямий FISH-аналіз безпосередньо в інтерфазних клітинах є надійним та інформативним методом швидкого виявлення мозаїцизму з високою чутливістю та специфічністю.

2. Підтвердженням високої валідності методу є значення коефіцієнтів асиметрії та ексесу. Вони ж можуть використовуватися для швидкої оцінки наявності патології.

3. Отримані результати свідчать про необхідність проведення молекулярно-цитогенетичної діагностики подружнім парам з безпліддям при виявленні навіть однієї клітини з анеуплоїдією за хромосомою X або Y стандартним цитогенетичним методом.

4. Результати, отримані після проведення FISH-діагностики, слід враховувати при проведенні медико-генетичного консультування сім'ї з метою розробки тактики ведення подружніх пар з проблемами репродукції.

Література

1. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man / A. Schinzel // New York: Walter de Gruyter. - 2001. - P. 360-368.
2. Krishna Murthy D. Recurrent regular trisomy-21 in two Bedouin families. Parental mosaicism versus genetic predisposition Krishna D. Murthy, T. Farag // Ann Genet. - 1995. - Vol. 38. - P. 217-224.
4. Bruye're H, Rupps R Kuchinka B, Friedman J, Robinson W. Recurrent trisomy 21 in a couple with a child presenting trisomy 21 mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 21 in the euploid cell line // Am. J. Med. Genet. - 2000. - 94. - P. 35-41.
5. Ворсанова С.Г. Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин / Ворсанова С. Г., Шаронин В. О., Курило Л. Ф. // Проблемы репродукции. - 1998. - 2. - С. 12-21.
6. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection / U. Mau, I. Backert, P. Kaiser, L. Kiesel // Hum. Reprod. - 1997. - Vol. 12. - P. 930-937.
7. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection - prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance / D. Meschede, B. Lemcke, J. Exeler [et al.] // Hum. Reprod. - 1998. - Vol. 13. - P. 576-582.
8. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection / B. Peschka, J. Leygraaf, van der Ven K. [et al.] // Hum Reprod. - 1999. - Vol. 14. - P. 2257-2263.
9. Increased frequency of chromosomal abnormalities in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection / Schreurs A., Legius E., Meuleman C. [et al.] // Fertil Steril. - 2000. - Vol. 74. - P. 94-96.
10. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men / J. Gekas, F. Thepot, C. Turleau [et al.] // Hum. Reprod. - 2001. - Vol. 16. - P. 82-90.
11. Yoshida A. Chromosome abnormalities and male infertility / A. Yoshida, M. Kazukiyo, M. Shirai // Assist Reprod Rev. - 1995. - Vol. 6. - P. 93-99.
12. Reproductive genetic counselling in non-mosaic 47,XXY patients: implications for preimplantation or prenatal diagnosis: Case report and review / G. Tachdjian, N. Frydman, Morichon-N. Delvallez [et al.] // Hum. Reprod. - 2003. - Volo. 18. - P. 271-275.
13. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele and idiopathic infertility of South Indian origin / Rao L., Babu A., M. Kanakavalli [et al.] // J. Androl. - 2004. - Vol. 25. - P. 147-153.
17. Impact of parental gonosomal mosaicism detected in peripheral blood on preimplantation embryos / Magli M., Gianaroli L., Ferraretti A. [et al.] // Reprod. Biomed Online. - 2002. - Vol. 5. - P. 306-312.
18. Kalousek D. Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development / D. Kalousek // J. Am. Med. Genet. - 2000. - Vol. 91. - P. 39-45.
19. Youssoufian H. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans / H. Youssoufian, R. Pyeritz / Nature - 2002. - Vol. 3. - P. 748-758.
20. Ворсанова С.Г., Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура // С.Г. Ворсанова, Ю.Б. Юров, В.Н. Чернышов . - Ростов-на-Дону - 1999. - 191с.
21. Variant Klinefelter syndrome patient with an XXY/XX/XY karyotype studied by GTG-banding and fluorescence in situ hybridization / Mark H., Bai H., Sotomayor E. et al. // Exp. Mol. Pathol. - 1999. - Vol. 67. - P. 50-56.
22. Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-color FISH in a 46,XY/47,XXY male / E. Chevret, S. Rousseaux, M. Monteil [et al.] // Hum. Genet. - 1996. - Vol. 97. - P. 171-175.
23. More F. Sex chromosome mosaicism in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection / F. Morel, F. Gallon, V Amice // Hum. Reprod. - 2002. - Vol. 17. - P. 2552-2555.
24. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization assessment of sex-chromosome mosaicism in Klinefelter's syndrome / N.B. Abdelmoula, A. Amouri, M. Portnoi [et al.] // Ann Genet. - 2004. - Vol. 47. - P. 163-175.
25. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype / N. Rives, G. Joly, A. Machy [et al.] // Mol. Hum. Reprod. - 2000. - Vol. 6. - P. 107-112.
26. Risk of trisomy 21 in offspring of patients with Klinefelter's syndrome / A. Hennebicq, R Pelletier, U. Bergues, S. Rousseaux / Lancet - 2001. - Vol. 357. - P. 2104-2105.
27. Venkataraman G. Triple-Y syndrome following ICSI treatment in a couple with normal chromosomes / G. Venkataraman, I. Craft // Hum. Reprod. - 2002. - Vol. 17. - P. 2560-2563.