

Оптимизация современной диагностики хромосомных аномалий, выявляемых у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции

А.С. Дарий, А.А. Степанов, С.В. Денисенко

Клиника проблем планирования семьи, г. Киев

Цель исследования: определение удельного веса молекулярно-цитогенетических методов в диагностике хромосомных аномалий у супружеских пар, обратившихся в Клинику проблем планирования семьи. Определение алгоритма прегравидарной подготовки супружеских пар исходя из результатов молекулярно-цитогенетического исследования.

Материалы и методы. Цитогенетический анализ проведен у 1812 супружеских пар (3624 пациента), молекулярно-цитогенетический анализ проведен у 426 пациентов.

Результаты. Применение молекулярно-цитогенетических технологий требовалось в 11,75% случаев. В большинстве случаев (78,2%) использование FISH необходимо с целью уточнения соотношения клеток с нормальным и аномальным клоном. Также молекулярно-цитогенетический метод необходим для уточнения точек разрыва хромосом, задействованных в сбалансированных транслокациях (15,8%). Еще одной группой пациентов, у которых применяли молекулярно-цитогенетические методы, были носители дополнительной маркерной хромосомы (2,9%).

Заключение. Была продемонстрирована эффективность применения молекулярно-цитогенетических методов в анализе геномных и хромосомных мутаций у супружеских пар, обратившихся в Клинику проблем планирования семьи. Результаты молекулярно-цитогенетического анализа учитывали в ходе прегравидарной подготовки. Знание генетических механизмов нарушения репродуктивной функции приобретает особое значение при преемственном обследовании супружеских пар с нарушением репродуктивной функции.

Ключевые слова: бесплодие, прегравидарная подготовка, хромосомная патология, геномные мутации, мозаицизм, молекулярно-цитогенетические методы.

Необходимость проведения анализа кариотипа супружеских пар с нарушением репродуктивной функции общепризнанна и доказана [1, 2]. У женщин с нарушением репродуктивной функции аномалии хромосом выявляют в 7–10% случаев (по данным различных источников, эти показатели варьируют от 1,1–3,3% до 15,3%). Среди мужчин геномные и хромосомные мутации наиболее часто встречаются при нарушенном сперматогенезе [1].

Выявление и идентификация хромосомных аномалий основывается на цитогенетическом анализе. Однако стандартные и высокочувствительные цитогенетические методы имеют целый ряд ограничений. В помощь цитогенетическим методам пришли молекулярно-цитогенетические: флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), многоцветная гибридизация *in situ* (multi-FISH), спектральное кариотипирование (SKY), сравнительная геномная гибридизация (CGH, aCGH) [7].

Цель исследования: определение эффективности применения молекулярно-цитогенетических методов в анализе геномных и хромосомных мутаций у супружеских пар, обратившихся в Клинику проблем планирования семьи. Описание случая прегравидарной подготовки супружеской пары с учетом результатов молекулярно-цитогенетического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективный анализ был проведен для определения удельного веса молекулярно-цитогенетических методов в диагностике хромосомных аномалий у супругов с бесплодием. Проанализированы результаты цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований. Цитогенетический анализ проведен у 1812 супружеских пар (3624 пациента), молекулярно-цитогенетический анализ проведен у 426 пациентов.

Цитогенетический анализ препаратов культивированных лимфоцитов периферической крови проводили по общепринятой методике [3]. Дифференциальное окрашивание выполняли GTG-методом, при необходимости – использовали QFQ- и CBG-методы. Хромосомный анализ проводили с помощью микроскопа «Olympus BX60» при увеличении 1000. Для каждого пациента анализировали по 16 метафаз, при выявлении мозаицизма количество анализируемых метафаз увеличивали до 50.

Молекулярно-цитогенетический анализ интерфазных ядер, прометафаз и метафаз проводили с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зондов производства фирмы Vysis, Abbott laboratories, IL USA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен ретроспективный анализ удельного веса молекулярно-цитогенетических методов в диагностике хромосомных аномалий у супругов с бесплодием. Цитогенетический анализ проводят всем супружеским парам, которые обращаются в Клинику проблем планирования семьи. Наиболее часто как у мужчин, так и у женщин выявляют аномалии половых хромосом (гоносом) [1].

Согласно литературным данным, у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции наиболее распространены геномные мутации с участием гоносом: синдром Клайнфельтера (полный и мозаичный варианты), синдром Шерешевского–Тернера (полный и мозаичный варианты, а также наличие в кариотипе структурных аномалий хромосомы X или Y), дисомия хромосомы Y. Также фиксируют Робертсоновские и сбалансированные транслокации, инверсии, инсерции, дополнительные маркерные хромосомы. В большинстве случаев эти аберрации выявляют в ходе цитогенетического анализа. Однако в ряде случаев стандарт-

ные методы анализа хромосом малоинформативны – 40% случаев нуждаются в дальнейшей молекулярно-цитогенетической диагностике [10].

Применение молекулярно-цитогенетических технологий понадобилось в 11,75% случаев. Большая часть таких случаев (78,2%) требовала применения FISH для выявления мозаицизма гоносом с целью уточнения соотношения клеток с нормальным и аномальным клоном, выявления «скрытого мозаицизма». Полученные результаты учитывали при медико-генетическом консультировании в прегравидарной подготовке супружеских пар.

На втором месте по частоте (15,8%) применения молекулярно-цитогенетического метода были случаи уточнения точек разрыва хромосом, задействованных в сбалансированных транслокациях, для этого использовали теломерные ДНК-зонды. Для таких семей был предложен следующий алгоритм: преимплантационная диагностика хромосомной аномалии – выявление сбалансированного или несбалансированного кариотипа у эмбриона [1].

Еще одной группой пациентов, для которых применяли молекулярно-цитогенетические методы, были носители дополнительной маркерной хромосомы (2,9%). Их идентификация осуществлялась с помощью многоцветовой FISH.

Остановимся на первой группе хромосомных аномалий, наиболее часто встречаемой у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции.

Соматический мозаицизм (наличие в организме генетически различных клеточных популяций) может обуславливать внутриутробную задержку развития или гибель плода, рождение ребенка с хромосомной патологией либо с пороками развития [10]. У носителей мозаичного клона клиническая картина более стертая, чем у индивидов с полной формой анеуплоидии, наличие стигм минимально [8]. Известны случаи мозаицизма по хромосомам 18 или 21 у фенотипически нормальных родителей детей с анеуплоидией (синдром Эдвардса, Дауна) [4]. Также соматический мозаицизм может быть причиной бесплодия.

Мозаицизм по гоносомам чаще всего диагностируют у носителей синдрома Шерешевского–Тернера, синдрома Клайнфельтера, при синдроме трисомии X. Так, синдром Шерешевского–Тернера в 40–50% случаев обусловлен моносомией по хромосоме X, остальные 50–60% случаев сопровождаются либо структурными перестройками хромосом X или Y, либо мозаицизмом [1]. Среди пациентов с синдромом Клайнфельтера мозаичный клон с дисомией хромосомы X выявляют в 15–20% (как варианты мозаицизма регистрируют кариотипы XY/XXY и XX/XXY). У мужчин с мозаичной формой синдрома Клайнфельтера наблюдают повышенную частоту аномалий гоносом в сперматозоидах (1,23–3,45%). Для таких пациентов риск рождения потомства с геномной мутацией повышен.

У супружеских пар с нарушением репродуктивной функции преобладают аномалии гоносом, в том числе мозаичные варианты. Следует отметить, что мозаицизм по хромосоме X чаще выявляют у женщин после 35 лет [9].

Выделяют случаи минимального («скрытого»), мозаицизма: анеуплоидия гоносом в небольшом проценте анализируемых клеток, а именно <10% и даже <6%. Такой незначительный клон трудно выявить при цитогенетическом анализе, а выявление одной клетки с аномальным количеством хромосомы X или Y при проведении стандартного цитогенетического анализа в большинстве случаев воспринимается цитогенетиками как артефакт и не фиксируется в цитогенетическом заключении. Влияние такого минимального мозаицизма на репродуктивную функцию супругов в настоящее время дискутируется.

Литературные источники свидетельствуют о большом разномнении не только в определении роли минимального мозаи-

цизма, но и в методологическом подходе (речь идет о количестве анализируемых метафаз для установления факта мозаицизма). Так, по рекомендациям Pescka и соавторов при выявлении 1 клетки из 20 проанализированных, следует продолжить анализ до 50–100 метафаз [6]. Другие авторы увеличивают количество клеток, подлежащих анализу, только до 30 [5].

Использование FISH не только позволяет точно выявить наличие/отсутствие клона (или клонов) клеток с аномальным количеством хромосомы X или Y, но и установить истинное соотношение клонов клеток.

Данное исследование показало, что FISH непосредственно на интерфазных клетках является надежным и информативным методом со 100-процентной чувствительностью и специфичностью для быстрого выявления мозаицизма. Также применение FISH на интерфазных ядрах у пациентов с минимальным процентом (<10%) мозаицизма гоносом позволило не только подтвердить наличие мозаичного клона, но и уточнить соотношение клеток с нормальным и аномальным наборами хромосом.

Представленный ниже клинический случай демонстрирует ход прегравидарной подготовки супружеской пары в соответствии с результатами цитогенетического и молекулярно-цитогенетического анализов при выявлении низкопроцентного мозаицизма.

В Клинику проблем планирования семьи (Киев, Украина) обратилась супружеская пара в связи с первичным бесплодием (10 лет). Супругу 50 лет, спермиологический анализ показал норму, кариотип: 46,XY, в первом браке двое детей.

Супруге 34 года, рост 175 м, масса тела 54,9 кг. Из анамнеза супруги: менархе в 14 лет, менструальный цикл регулярный. При обследовании были выявлены: эндометриозные кисты обоих яичников, хронический двусторонний сальпингит, спаечный процесс органов малого таза, эндометриоз органов брюшной полости. В ходе лапароскопии пациентке произведена цистэктомия, коагуляция очагов эндометриоза.

При проведении цитогенетического анализа у супруги был выявлен мозаицизм гоносом. Кариотип: 49,XXXXX[1]/47,XXX[1]/46,XX[48].

Молекулярно-цитогенетический анализ на интерфазных ядрах подтвердил наличие клонов клеток с три-, тетра- и пентасомией по хромосоме X, а также выявил клон клеток с моносомией хромосомы X. Запись кариотипа после анализа с помощью FISH следующая:

- nuc ish Xcen(DXZ1x1)[13]/nuc ish Xcen(DXZ1x3)[9]/
- nuc ish Xcen(DXZ1x4)[4]/nuc ish Xcen(DXZ1x5)[3]/nuc ish Xcen(DXZ1x2)[511].

После проведения лечебной программы ЭКО с ICSI была получена одноплодная беременность. Цитогенетический анализ ворсин хориона показали нормальный кариотип у плода во всех проанализированных клетках (всего проанализировано 50 клеток). Беременность закончилась на 34-й неделе рождением девочки: масса тела 2000 г, рост 47 см. Ребенок развивается нормально.

ВЫВОДЫ

Данный клинический случай свидетельствует о необходимости проведения молекулярно-цитогенетической диагностики у супружеских пар с бесплодием при выявлении цитогенетическим методом даже одной клетки с анеуплоидией. Результаты, полученные после проведения диагностики с помощью FISH, следует учитывать при медико-генетическом консультировании семьи с целью разработки дальнейшей тактики ведения супружеских пар с проблемами репродукции.

Знание генетических механизмов нарушения репродуктивной функции приобретает особое значение при преконцепционном обследовании супружеских пар с нарушением репродуктивной функции.

Оптимизация современной диагностики хромосомных аномалий, выявляемых у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции

А.С. Дарий, А.А. Степанов, С.В. Денисенко

Мета дослідження: визначення питомої ваги молекулярно-цитогенетичних методів у діагностиці хромосомних аномалій серед подружніх пар, які звернулися у Клініку проблем планування сім'ї. Визначення алгоритму прегравідарної підготовки подружніх пар виходячи з результатів молекулярно-цитогенетичного дослідження.

Матеріали та методи. Цитогенетичний аналіз проведено у 1812 подружніх пар (3624 пацієнта), молекулярно-цитогенетичний аналіз проведено у 426 пацієнтів.

Результати. Застосування молекулярно-цитогенетичних технологій було необхідно у 11,75% випадків. У більшості випадків (78,2%) застосування FISH краще потрібно з метою уточнення співвідношення клітин з нормальним та аномальним клонами. Також молекулярно-цитогенетичний метод застосовували для уточнення точок розриву хромосом, які задіяні у збалансовані транслокації (15,8%), Ще одна група пацієнтів, у яких застосовували молекулярно-цитогенетичні методи, були носіями додаткових маркерних хромосом (2,9%).

Заключення. Була продемонстрована ефективність застосування молекулярно-цитогенетичних методів у ході аналізу геномних і хромосомних мутацій у подружніх пар, які звернулися у Клініку проблем планування сім'ї. Результати молекулярно-цитогенетичного аналізу урахували в ході прегравідарної підготовки. Знання генетичних механізмів порушення репродуктивної функції має особливе значення при прекоцепційному обстеженні подружніх пар з порушенням репродуктивної функції.

Ключові слова: безплідність, прегравідарна підготовка, хромосомна патологія, геномні мутації, мозаїцизм, молекулярно-цитогенетичні методи.

Optimization of modern diagnosis of chromosomal abnormalities detected in couples with reproductive dysfunction

A.S. Dariy, A.A. Stepanov, S.V. Denisenko

The objective: To define the percentage of molecular-cytogenetic methods in chromosomal anomalies diagnosis among the couples who had visited Human Reproduction Problems Clinic. To define the algorithm of pregravidate service of couples using the molecular-cytogenetic results.

Patients and methods. Cytogenetic analysis was performed for 1812 couples (3624 patients) who visited Human Reproduction Problems Clinic. Molecular-cytogenetic analysis was performed for 426 patients.

Results. Molecular-cytogenetic methods were used in 11,75% cases. Mostly (in 78,2% cases) it was used for knowing the correlation between normal and abnormal clones in karyotype. Also it was used for identification of balanced translocations breakpoints (in 15,8% cases) and for identification of marker chromosomes (2,9% cases).

Conclusions. Our results demonstrate effectiveness of molecular-cytogenetic methods for genome and chromosomal mutations analysis among couples with reproductive problems. The results were taken in account during pregravidate service of couples with reproductive problems. Knowing of genetic mechanisms of reproductive failure is importing for preconception examination.

Key words: infertility, pregravidate service, chromosomal pathology, genome mutations, mosaicism, molecular-cytogenetic methods.

Сведения об авторах

Дарий Александр Семенович – Клиника проблем планирования семьи МОЗ Украины, 03037, г. Киев, проспект Лобановского, 17; тел.: (044) 244-77-53

Степанов Александр Александрович – Клиника проблем планирования семьи, 03037, г. Киев, проспект Лобановского, 17; тел.: (044) 244-77-53

Денисенко Сергей Викторович – Клиника проблем планирования семьи МОЗ Украины, 03037, г. Киев, проспект Лобановского, 17; тел.: (044) 244-77-53

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Денисенко С.В. Генетика репродукції / С.В. Денисенко, А.С. Дарий, М.И. Кононенко, Т.Э. Зерова-Любимова. – К.: Ферзь-ТА, 2008. – 650 с.
2. Денисенко С.В. Распределение хромосомных аномалий среди супружеских пар с нарушением репродуктивной функции / С.В. Денисенко, А.С. Дарий, М.И. Кононенко, Т.Э. Зерова-Любимова / Современные технологии в педиатрии и детской хирургии: Материалы VII Российского конгресса Современные технологии в педиатрии и детской хирургии (21–23 октября 2008 г.). – М., 2008. – С. 77.
3. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: метод. рекомендації / Міністерство охорони здоров'я України; уклад.: Зерова-Любимова Т.Е., Горovenko Н.Г. – Київ, 2003. – 25 с.
4. Bruye're H. 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 / H. Bruye're, R. Rupp, B. Kuchinka, J. Friedman, W. Robinson // Am.J.Med.Genet. – 2000. – V. 94 (1). – P. 35–41.
5. Gekas J. 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, J.P. Siffroi, J.P. Dadoune, S. Briault, M. Rio, G. Bourouillou // Hum. Reprod. – 2001. – V. 16 (1). – P. 82–90.
6. Peschka B. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection / B. Peschka, J. Leygraaf, K. van der Ven, M. Montag, B. Scharmann, R. Schubert, H. van der Ven, G. Schwanitz // Hum Reprod. – 1999. – 14 (9). – P. 2257–2263.
7. Riegel M. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides / M. Riegel // Genet. Mol. Biol. – 2014. – 37 (1 S). – P. 194–209.
8. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man / Albert Schinzel; Walter de Gruyter. – New York, 2001. – 966 p.
9. Schreurs A. Increased frequency of chromosomal abnormalities in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection / A. Schreurs, E. Legius, C. Meuleman, J.-P. Fryns, T. D'Hooghe // Fertil Steril. – 2000. – 74 (1). – P. 94–96.
10. Vorsanova S.G. Chromosomal mosaicism in spontaneous abortions: analysis of 650 cases/ S.G. Vorsanova, I.Iu. Iurov, A.D. Kolotii, A.K. Beresheva, I.A. Demidova, O.S. Kurinnaia, V.V. Monakhov, I.V. Solov'ev, Iu.B. Iurov // Genetika. – 2010. – 46 (10). – P. 1356–1359.

Статья поступила в редакцию 07.12.16