

# Хромосомні аномалії у пар з невиношуванням вагітності в циклах допоміжних репродуктивних технологій

В.Г. Дубініна<sup>1</sup>, О.М. Носенко<sup>1</sup>, К.П. Головатюк<sup>2</sup>, А.І. Пацкова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Одеський національний медичний університет

<sup>2</sup>Медичний центр репродуктивного здоров'я «Гамета», м. Одеса

<sup>3</sup>Центр відновної та реконструктивної медицини (Університетська клініка), м. Одеса

**Мета дослідження:** оцінювання ролі хромосомних аномалій у подружніх пар у розвитку невиношування вагітності в циклах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ).

**Матеріали та методи.** Проаналізовані результати дослідження каріотипу подружніх пар з невиношуванням вагітності після запліднення з використанням циклів ДРТ. Цитогенетичний аналіз проводили на GTG-фарбованих метафазних пластинах лімфоцитів периферійної крові відповідно до Міжнародної системи номенклатури в цитогенетиці людини (ISCN 2013).

**Результати.** Аномальні каріотипи зустрічалися у 10,00% нормальних за фенотипом пацієнтів, яким використовували ДРТ, з невиношуванням вагітності, у тому числі серед чоловіків – у 9,17%, серед жінок – у 10,83% випадків. Найчастішими хромосомними аномаліями серед пацієнтів програми ДРТ з невиношуванням вагітності були реципрокні та робертсонівські транслокації.

**Заключення.** Хромосомні аномалії у чоловіків та жінок є одним з важливих чинників втрат вагітності після проведення ДРТ. Цитогенетичне дослідження слід проводити усім чоловікам та жінкам з подружжів – пацієнтів програм ДРТ з попереднім невиношуванням вагітності.

**Ключові слова:** допоміжні репродуктивні технології, невиношування вагітності, каріотип, хромосомні аномалії, лімфоцити периферійної крові.

Частота настання вагітності при проведенні допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) є стабільною на рівні близько 40%, число живонароджень складає лише 20–30%, а спонтанних абортів – 22–63% [12]. Серед численних чинників до мимовільного переривання вагітності може призводити генна або хромосомна патологія у батьків [4–6, 14]. Згідно з результатами цитогенетичного дослідження подружжів з репродуктивними проблемами, частота хромосомних аномалій для популяції нашого населення коливається від 4,3% до 9,6% [1]. При цьому встановлено, що частота зустрічальності аномалій каріотипу в групі пацієнтів з невиношуванням вагітності вища, ніж в групах первинного та вторинного безпліддя [2]. Лікування методами ДРТ пацієнтів–носіїв хромосомних перебудов без урахування особливостей їхнього генотипу може дати численні негативні результати проведення програми запліднення *in vitro*, вплинути на виношування вагітності, привести до повторювання спонтанного переривання вагітності і, в кінці кінців, до народження дитини з вродженими вадами розвитку [3, 4, 6].

За даними літератури, хромосомні транслокації є основними аномальними каріотипами, пов'язаними зі спонтанними абортами. Шанс знайти хромосомні аберації збільшується з зростанням числа спонтанних абортів. Хромосомні аномалії

частіше зустрічаються у жінок з кількістю мимовільних абортів три та більше [8].

Однією з основних методик цитогенетичної діагностики подружніх пар з репродуктивними проблемами є визначення каріотипу з використанням для діагностики культивованих лімфоцитів периферійної крові. Оскільки лейкоцити є остаточною, але диференційованими клітинами, які не здатні до поділу, то для отримання метафазних (видимих при світловій мікроскопії) хромосом культуру крові стимулюють до поділу, зупиняють поділ клітин на стадії метафази і після видалення еритроцитів і інших клітинних елементів крові отриману суспензію лейкоцитів фіксують і наносять на предметні скла. При потрапленні метафазної клітини на поверхню скла її оболонка лопається і хромосоми «висипаються» на скло в довільному порядку. Для візуалізації хромосом використовують різні методи диференційованого забарвлення [1].

Числові (кількісні) хромосомні аберації (від лат. aberratio – відхилення) включають анеуплоїдії (зміна числа хромосом, кратна хромосомному набору) і поліплоїдії (зміна числа хромосом, кратна хромосомному набору). Під час оцінювання структурних хромосомних аберацій визначають такі перебудови, як: del – делеція (втрата ділянки хромосоми); dup – дуплікація (подвоєння ділянки хромосоми); t – транслокація (переміщення ділянки хромосоми); inv – інверсія (поворот ділянки хромосоми на 180°); der – виявлення дериватної хромосоми; mar – виявлення маркерної хромосоми [1].

Роботи, присвячені вивченню каріотипу подружжів з невиношуванням вагітності після проведення ДРТ, в літературі поодинокі та суперечливі внаслідок різноманітності досліджуваного матеріалу.

**Мета дослідження:** оцінювання ролі хромосомних аномалій у подружніх пар в розвитку невиношування вагітності в циклах ДРТ.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено цитогенетичні дослідження лімфоцитів 240 зразків периферійної крові пацієнтів безплідних подружніх пар з нормальними фенотипічними характеристиками та з втратами вагітності, які настали в циклах ДРТ. Подружні пари проходили лікування в Медичному центрі репродуктивного здоров'я «Гамета» м. Одеси та Університетській клініці «Центр відновної та реконструктивної медицини» Одеського національного медичного університету. Біохімічні вагітності не враховували. Пацієнти були обстежені перед проведенням ДРТ відповідно до Наказу МОЗ України від 09.09.2013 № 787. Настання вагітності було підтверджено даними початкового УЗД в 4–5 тиж вагітності з візуалізацією плодового яйця, при яких була виключена поза-маткова імплантація та/або на 5–6-му тижні з візуалізацією серцевої діяльності ембріона.

Таблиця 1

**Аномалії в каріотипі чоловіків з подружніх пар з невиношуванням вагітності в циклах ДРТ, п(%)**

Хромосомні аномалії у досліджуваних чоловіків (n=240)		n (%)
Вид хромосомної аномалії	Виявлені формули каріотипу	
Дисомія за Y-хромосомою	47,XXY 47,XXY	2 (0,83)
Робертсонівська транслокація	45,XY, der(15;15)(q10;q10) 45,XY, der(13;14)(q10;q10) 45,XY, der(13;14)(q10;q10) 45,XY, der(13;14)(q10;q10) 45,XY,der(13;21)(q10;q10) 45,XY,der(21;22)(q10;q10)	6 (2,50)
Реципрокна транслокація	46,XY,t(4;6)(q23;q21) 46,XY,t(4;20)(q32;p12) 46,XY,t(6;10)(p25;p11.2) 46,XY,t(6;16)(q26;p12) 46,XY,t(7;8)(p21; q11.2) 46,XY,t(7;18)(p21.3;q12.2) 46, XY,t(11;22)(q23;q11) 46, XY,t(12;22)(p11.2;p11.2)	8 (3,33)
Маркерна хромосома	47,XY,+mar 47,XY,+mar	2 (0,83)
Інверсія	46, X, inv(Y)(p11.2q11.22) 46, XY, inv(4)(p16;q21.1) 46, XY, inv(10)(p14q21)	3 (1,25)
Мозаїцизм	46,XY (90%)/46,X del(Y) (10%)	1 (0,42)
<b>Усього</b>		<b>22 (9,17)</b>

Таблиця 2

**Аномалії в каріотипі жінок з подружніх пар з невиношуванням вагітності в циклах ДРТ, п(%)**

Хромосомні аномалії у досліджуваних жінок (n=240)		n (%)
Вид хромосомної аномалії	Виявлені формули каріотипу	
Трисомія за X-хромосомою	47, XXX 47, XXX	2 (0,83)
Моносомія за X-хромосомою	45, X	1(0,42)
Робертсонівська транслокація	45, XX der (13;14)(p11;q11) 45, XX, der (14; 21)(q10;q10) 45, XX, der (13;14)(q10;q10) 45, XX der (14;15)(q10;q10)	4 (1,67)
Реципрокна транслокація	46, XX, t (1: 12) (p22;q13) 46, X,t(2;7)(q37.1;q32) 46,XX,t(2;7)(q34;q34) 46, X,t(3;6)(q29;p21.1) 46,XX,t(5;6)(q34;p21.2) 46,XX,t(7;14)(q36;q24.3) 46,XX,t(8;11)(p23;q21) 46,XX,t(10;17)(p13;q21.3) 46,XY,t(11;22)(q23;q11) 46,XX,t(13;15)(q10;q10)	10 (4,17)
Маркерна хромосома	47,XX, +mar 47,XX, +mar 47,XX, +mar	3 (1,25)
Інверсія	46,XX, inv(9)(p11 q13) 46,XX, inv(9)(p11 q12)	2 (1,67)
Мозаїцизм	46,XX(90%)/45,X(10%)	2 (0,83)
	46,XX(90%)/47,XXX(10%)	1 (0,42)
	46,XX(90%)/45,X(6%)/47,XXX (4%)	1 (0,42)
<b>Усього</b>		<b>26 (10,83)</b>

Дослідження каріотипу лімфоцитів периферійної крові пацієнтів досліджуваних пар проводили після культивування периферійної крові на середовищі RW-MAX™ (Gibco®, Germany) протягом 72 год. Для підвищення мітотичного індексу культури лімфоцитів периферійної крові та отримання метафазних пластин із високою роздільною здатністю застосовували синхронізацію культури метотрексатом на 48

год культивування (концентрація  $1 \times 10^{-6}$  М). Через 18 год для зняття блокування S-фази додавали тимидин у концентрації  $1 \times 10^{-4}$  М (Cell Synchronization Kit, Biological Industries, Israel). Для зупинки клітинних поділів на стадії метафази використовували CaryoMAX® Colcemid (Gibco®, Germany) у кінцевій концентрації 10 мкг/мл. Гіпотонічне оброблення проводили 0,55 М розчином KCl, фіксацію культури –

фіксатором Карнуа (метанол та оцтова кислота у співвідношенні 3:1). Отриману суспензію клітин розкагували на попередньо знежирені та охолоджені предметні скельця [10]. Проводили GTG-зabarвлення препаратів: обробляли 0,25% розчином трипсину (Gibco®, Germany) та фарбували барвником Гімза (Applichem, Germany) [11].

Цитогенетичний аналіз проводили на GTG-фарбованих метафазних пластинках лімфоцитів периферійної крові з роздільною здатністю у 450–550 та більше дисків на гаплоїдний геном відповідно до Міжнародної системи номенклатури в цитогенетиці людини (ISCN 2013) [13]. За необхідності застосовували допоміжні методи фарбування (СВГ, NOR). Цитогенетичний аналіз проводили із використанням світлового мікроскопу AxioImager M1 (Zeiss, Germany); фотодокументацію здійснювали із використанням програмного забезпечення Ikaros 2.0 (MetaSystems, Germany). У кожному випадку аналізували 20 метафазних пластин; при підозрі на мозаїцизм кількість проаналізованих пластин збільшували до 50. Хромосомними аномаліями вважали кількісні та структурні перебудови хромосом; поліморфні варіанти розглядали як варіант норми [13].

Отримані дані обробляли за допомогою IBM PC з використанням електронної таблиці «EXCEL».

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

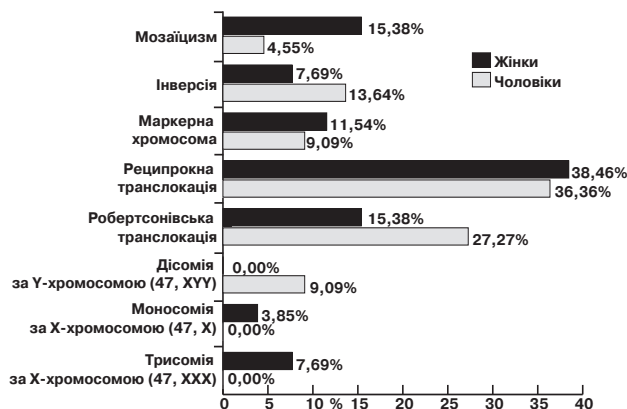
Середній вік обстежених жінок групи Н складав 29,80±0,30 року, чоловіків – 32,40±1,07 року. Переривання вагітності в групі Н у І триместрі мали 51,25% (123) пацієнок, в II – 34,17% (82), в III – 14,58% (35).

Хромосомні перебудови в загальній групі пацієнтів були виявлені у 10,00% (48/480) випадків, у тому числі серед чоловіків – у 9,17% (22/240) (табл. 1), у жінок – у 10,83% (26/240) (p>0,05) (табл. 2), що свідчить про рівномірний внесок цитогенетичних особливостей будь-кого з подружжя в невиношування вагітності після ДРТ. Слід звернути увагу на те, що в нашому дослідженні аномалії каріотипу серед сімейних пар виявлялися тільки у одного з подружжя.

Як видно з малюнку, серед виявлених хромосомних перебудов у пацієнтів програм ДРТ з невиношуванням вагітності, як у чоловіків (n=22), так і у жінок (n=26), переважали реципрокні та робертсонівські транслокації. Значно рідше зустрічалися числові хромосомні аномалії.

Найчастіше серед досліджуваних пацієнтів зустрічалися реципрокні транслокації – у 3,75% (18/480) випадків, при яких відбувався взаємний обмін ділянками між хромосомами. Серед чоловіків реципрокні транслокації виявляли у 3,33% (8/240), а серед жінок – у 4,17% (10/240) осіб (p>0,05). Робертсонівські транслокації, при яких рееструвалося злиття акроцентричних хромосом з повною або частковою втратою матеріалу коротких плечей, були у 2,08% (10/480) досліджуваних, з яких у 2,50% (6/240) – серед чоловіків і 1,67% (4/240) – серед жінок. Отримані дані співпадають з даними літератури про те, що популяційна частота таких збалансованих транслокацій в популяції не перевищує 0,1%, а їхня частота в групах чоловіків та жінок з репродуктивними проблемами сягає 3,0–6,2% і 0,7–9,8% відповідно [3, 9]. У нашому дослідженні частота хромосомних транслокацій серед чоловіків та жінок не мала вірогідних відмінностей. За даними авторів [7], частота транслокацій у жінок з подружжів зі звичним невиношуванням вагітності вдвічі перевищує таку у чоловіків. За результатами проведеного нами дослідження найчастіше в транслокації при невиношуванні вагітності залучалися хромосоми 6, 7, 11, 13, 14, 15 і 22.

У 1,04% (5/480) досліджуваних виявляли інверсії, при якій мав місце поворот ділянки хромосоми на 180°: серед пацієнтів чоловічої статі – у 1,25% (3/240), жіночої – у 0,83%



### Відсотковий склад виявлених хромосомних аномалій у пацієнтів програм ДРТ з невиношуванням вагітності

(2/240). У чоловіків були виявлені інверсії хромосом Y, 4 і 10, а у жінок – хромосоми 9. Більшість лікарів розглядають інверсію хромосоми 9 як доброякісний хромосомний поліморфізм [6]. Значення варіантів є предметом дискусій, тому що велика кількість таких інверсій була виявлена в нормальних популяціях. Отримані нами дані щодо інверсії хромосоми 9 співпадають з результатами [6].

0,21% (1) жінок мали моносомію за X-хромосомою, 0,21% (1) – гоносомну трисомію за X-хромосомою (47, XXX), 0,42% (2) – гоносомну дісомію за X-хромосомою (47, XXU).

Маркерну хромосому, яку неможливо диференціювати загальновідомими методами диференційованого фарбування, відзначали в 1,04% (5) випадків.

Виявлені особливості хромосомних аномалій у подружніх пар з невиношуванням вагітності в циклах ДРТ свідчать, що хромосомний аналіз таких пар слід обов'язково проводити. Хромосомна аномалія, виявлена у будь-якого з батьків, може допомогти оцінити вірогідний прогноз щодо майбутніх вагітностей, бо ризик викиднів у пар з транслокаціями становить близько 25–50%, з робертсонівською транслокацією – близько 25%. Проведене дослідження підкреслює важливість комплексного обстеження подружніх пар зі спонтанними абортми в циклах ДРТ, яке враховує різні етіологічні фактори невиношування, у тому числі генетичні, для того, щоб знайти причину репродуктивної недостатності. Постраждали пари повинні отримати ефективне медико-генетичне консультування і прийняти доцільне рішення сумісно з лікарями-репродуктологами, андрологами, цитогенетиками, ембріологами про подальші репродуктивні можливості та технології для їх здійснення (передімплантаційна генетична діагностика по бластомерах або клітинах бластоцисти з метою селекції здорових ембріонів, донація овоцитів, донація сперматозоїдів і т.д.).

### ВИСНОВКИ

1. Хромосомні аномалії у чоловіків та жінок є одним з важливих чинників спонтанних втрат вагітності при проведенні ДРТ. Аномальні каріотиби зустрічаються у 10,00% нормальних за фенотипом пацієнтів ДРТ з невиношуванням вагітності, у тому числі серед чоловіків – у 9,17%, у жінок – у 10,83% випадків.

2. Найбільш частими хромосомними аномаліями серед пацієнтів ДРТ з невиношуванням вагітності є реципрокні та робертсонівські транслокації.

3. Усім чоловікам та жінкам з подружніх пар – пацієнтів програм ДРТ з попереднім невиношуванням вагітності потрібно проводити цитогенетичне дослідження.

**Хромосомные аномалии у пар с невынашиванием беременности в циклах вспомогательных репродуктивных технологий**

**В.Г. Дубинина, Е.Н. Носенко, Е.П. Головатюк, А.И. Пацкова**

**Chromosomal abnormalities in couples with miscarriage in cycles of assisted reproductive technology**

**V.G. Dubinina, O.M. Nosenko, K.P. Golovatyuk, A.I. Patskova**

**Цель исследования:** оценка роли хромосомных аномалий у супружеских пар в развитии невынашивания беременности в циклах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

**Материалы и методы.** Проанализированы результаты исследования кариотипа супружеских пар с невынашиванием беременности после оплодотворения в циклах ВРТ. Цитогенетический анализ проводили на GTG-окрашенных метафазных пластинках лимфоцитов периферической крови в соответствии с Международной системой номенклатуры в цитогенетике человека (ISCN 2013).

**Результаты.** Аномальные кариотипы выявлены у 10,00% нормальных по фенотипу пациентов с использованием ВРТ с невынашиванием беременности, в том числе среди мужчин – у 9,17%, среди женщин – у 10,83% случаев. Наиболее частыми хромосомными аномалиями среди пациентов, которым применяли ВРТ, с невынашиванием беременности были реципрокные и робертсоновские транслокации.

**Заключение.** Хромосомные аномалии у мужчин и женщин являются одним из важных факторов потерь беременности после проведения программ ВРТ. Ультразвуковое исследование следует проводить всем мужчинам и женщинам с супругами – пациентами программ ВРТ с предыдущим невынашиванием беременности.

**Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии, невынашивание беременности, кариотип, хромосомные аномалии, лимфоциты периферической крови.

**The purpose of research:** to evaluate the role of chromosomal abnormalities in couples in the development of miscarriage in cycles of assisted reproductive technology (ART).

**Material and methods.** The results of the study of the karyotype couples with miscarriage after fertilization in ART cycles. Cytogenetic analysis was performed on GTG-stained metaphase plates of peripheral blood lymphocytes according to the International System of Nomenclature in human cytogenetics (ISCN 2013).

**Results.** Abnormal karyotypes were found in 10.00% of the normal phenotype of ART patients with miscarriage, including men – to 9,17%, among women – in 10,83% of cases. The most frequent chromosomal abnormalities in patients with ART miscarriage were reciprocal and Robertsonian translocations.

**Conclusion.** Chromosomal abnormalities in men and women is an important factor in the loss of pregnancy after ART. Ultrasound examination should be carried out to all men and women with spouses – patients ART programs from the previous miscarriage.

**Key words:** assisted reproductive technologies, miscarriage, karyotype, chromosomal abnormalities, peripheral blood lymphocytes.

**Сведения об авторах**

**Дубинина Владлена Геннадиевна** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (048) 723-84-41. E-mail: vladlena.od@gmail.com

**Носенко Елена Николаевна** – Одесский национальный медицинский университет, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (048) 723-84-41. E-mail: nosenko.olena@gmail.com

**Головатюк Екатерина Петровна** – ООО «Медицинский центр репродуктивного здоровья «Гамета»», 65039, г. Одесса, ул. Слепнева, 3-А; тел.: (048) 738-68-69. E-mail: info@gameta.od.ua

**Пацкова Анастасия Игоревна** – Одесский национальный медицинский университет, Центр восстановительной и реконструктивной медицины (Университетская клиника ОНМедУ), 65009, г. Одесса, ул. Тенистая, 8; (048) 787-14-41; 770-69-00. E-mail: dr.patskova@mail.ru

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Бровко А.А. Кариотипирование супружеской пары – важный диагностический шаг при проблемах в репродуктивной сфере / А.А. Бровко // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2014. – № 3 (78). – С. 71–75.
- Ким О.А. Частота цитогенетических аномалий в семьях больных с нарушением репродуктивной функции / Ким О.А., Колесников О.Л., Чувакова Д.А. // Проблемы репродукции. – 2011. – № 6. – С. 52–56.
- Тавокина Л.В. Репродуктивная генетика. Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики / Л.В. Тавокина // Здоровье женщины. – 2014. – № 6 (92). – С. 106–112.
- A cytogenetic study of couples with miscarriages: An experience from Manipal Referral Centre / Rajasekhar M., Gopinath P.M., Sreelakshmi K. [et al.] // Int. J. Hum. Genet. – 2013. – Vol. 13. – P. 93–97.
- Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors / Jia C.W., Wang L., Lan Y.L. [et al.] // Chin. Med. J. – 2015. – Vol. 128. – P. 2772–2776.
- Baghbani F. Association of heteromorphism of chromosome 9 and recurrent abortion (ultrasound diagnosed blighted ovum): A case report / Baghbani F., Mirzaee S., Hassanzadeh-Nazarabadi M. // Iran J Reprod Med. – 2014. – Vol. 12. – P. 357–360.
- Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in southern region of India: report and review / Dutta U.R., Rajitha P., Pidugu V.K. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2011. – Vol. 28, № 2. – P. 145–149.
- Cytogenetic study of 1780 cases of spontaneous abortion / Qian W.P., Tan Y.M., Li M.Q. [et al.] // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2005. – Vol. 30, № 3. – P. 258–260.
- De P. Novel balanced chromosomal translocations in females with recurrent spontaneous abortions: Two case studies / De P., Chakravarty S., Chakravarty A. // J. Hum. Reprod. Sci. – 2015. – Vol. 8, № 2. – P. 114–117. doi: 10.4103/0974-1208.158623.
- Hungerford D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D.A. Hungerford // Stain. Technol. – 1965. – Vol. 40. – P. 333–338.
- Ponnuraj K.T. Cytogenetic techniques in diagnosing genetic disorders, advances in the study of genetic disorders / K.T. Ponnuraj. – China: In Tech, 2011. – 21 p.
- Risk of Chromosomal Abnormalities in Early Spontaneous Abortion after Assisted Reproductive Technology: A Meta-Analysis / J.-Zh. Qin, L.-H. Pang, M.-Q. Li [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (10): e75953. Published online 2013 October 10. doi: 10.1371/journal.pone.0075953.
- Shaffer L.G. ISCN 2013: International System for Human Cytogenetic Nomenclature / L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. – Karger, 2013. – 140 p.
- Structural chromosomal abnormalities in couples with recurrent abortion in Egypt / Gaboon N.E., Mohamed A.R., Elsayed S.M. [et al.] // Turk. J. Med. Sci. – 2015. – Vol. 45, № 1. – P. 208–213.

Статья поступила в редакцию 20.01.2016