

контролем при збільшенні частки парних мостів. Зміни кількості аберацій на аберантну клітину з дозою мутагену не були такими значними, як за критерієм частота аберантних клітин. Наростання пошкодженості аберантної клітини відбувається набагато повільніше. Дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних спостерігається лише за умов значного мутагенного навантаження.

**Ключові слова:** клітини *Allium cepa* L., аберації хромосом, діоксидин.

#### Резюме

**Бариляк І.Р., Шкарупа В.М., Неумержицкая Л.В.** *Характеристика спектра аберацій, індукцирваних двооксином в клітках *Allium cepa* L.*

Исследовали особенности спектра аберацій хромосом, індукцирваних двооксином в клітках корневої меристеми *Allium cepa* L. Аналізували дозові залежності по критеріям: доля всіх мостів і подвійних (парних) мостів, пошкодженість аберантної клітки, частота мультиаберантних кліток. В спектрі аберацій хромосом, індукцирваних мутагеном переважають хроматидні аберації обмінного типу. При підвищенні концентрації мутагену спостерігається зменшення частоти всіх мостів в порівнянні з контролем при збільшенні частоти подвійних (парних) мостів. Зміни кількості аберацій на аберантну клітку при збільшенні дози мутагену не були такими значущими, як по критерію частота аберантних кліток. Збільшення пошкодженості аберантної клітки відбувається значущо повільно. Дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних кліток спостерігається тільки при умови значущої мутагенної навантаженості.

**Ключові слова:** клітки *Allium cepa* L., аберації хромосом, діоксидин.

#### Summary

**Barilyak I.R., Shkarupa V.M., Neumergitskaya L.V.** *Characteristic of a spectrum of aberrations of the chromosomes induced of dioxidin in cells root meristem *Allium cepa* L.*

Investigated features of a spectrum of aberrations of the chromosomes induced of dioxidin in cells root meristem *Allium cepa* L. Analyzed the dose response by criteria: a share of all bridges and double bridges, quantity of aberrations per aberrant cell, frequency multiaberrant cells. In a spectrum of aberrations of the chromosomes induced of mutagen prevail chromatide aberrations of exchange type. At increase of concentration mutagens reduction of a share of all bridges in comparison with the control over increase in a share of double bridges is observed. Changes of quantity of aberrations per aberrant cell at increase in a doze of mutagen were not such significant, as by criterion frequency aberrant cells. The increase quantity of aberrations per aberrant cell occurs much more slowly. Doze dependences the increase in frequency of multiaberrant cells is observed only under condition of significant mutagen loading.

**Key words:** cells *Allium cepa* L., aberrations of chromosomes, dioxidin.

УДК 61.35:575.056.3

## РЕЗУЛЬТАТИ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ПОДРУЖНИХ ПАР З ПЕРВИННИМ ТА ВТОРИННИМ НЕПЛІДДЯМ

**Н.Л. Гулеюк, І.Є. Гуменецький, Д.В. Заставна,  
Н.В. Гельнер, І.А. Біль**

*Інститут спадкової патології АМН України (Львів)  
Львівський міжобласний медико-генетичний центр  
Львівський державний обласний перинатальний центр*

#### Вступ

За останні роки спостерігається неухильне зростання порушень репродукційної функції людини, яке відображається у збільшенні подружніх пар з первинним та вторинним непліддям та народженням дітей з вадами розвитку. На сьогоднішній день близько 14% подружніх пар страждають непліддям. Цитогенетичне обстеження є обов'язковим для неплідних пар, так як частота змін каріотипу серед них коливається в межах 2,5 - 10%. Характерними є транслокації, інверсії та кількісні аномалії хромосом [1,2]. Оскільки носії збалансованих перебудов хромосом в загальній популяції зустрічаються приблизно 1:400 або 1:500 новонароджених [цит.по 3], частота подружніх пар, в яких один з партнерів є носієм збалансованої транслокації, складає 1:100-200 [цит.по 3]. Винятком є інверсія прицентромерного гетерохроматина хромосоми 9 або 9ph (популяційна частота - 1-3%), яка на даний момент вважається варіантом норми [4].

Гоносомна моносомія Х-хромосоми (регулярна чи мозаїчна форми) - с.Тернера - є найчастішою генетично зумовленою формою жіночого непліддя. Частота регулярної Х-моносомії - 1:1500 живонароджених дівчат [5]. Характерні структурні перебудови Х-хромосоми, зокрема делеції та транслокації. Причому делеції зустрічаються в усіх ділянках, окрім Хр22.2-22.3 та Хq27-28. Транслокації Х; аутономи зустрічаються з частотою 1:30000 серед новонароджених. Характерною особливістю таких перебудов є те, що всі чоловіки-носії та більше

50% жінок - носіїв є неплідними. Найчастіше у таких транслокаціях задіяні аутосоми 15, 21 та 22 [6].

У жінок з непліддям спостерігаються хромосомні перебудови, в яких задіяні наступні ділянки аутосом: 1p31, 2p16-p21, 3p21.1-p21.2, 4q21.2, 5q, 6p14.2-p15, 7q31.3, 9q13, 9q33, 10q24.2, 11p13, 15q21.1, 19q13.3, 21q22.3. Вважається, що порушення репродуктивної функції в цих випадках пов'язане з розташуванням в перчислених ділянках генів, відповідальних за статевий розвиток [цит. по 7]. Результати масштабного каріотипування чоловіків з непліддям (більше 10000 осіб) дозволили встановити аномалії хромосом у ~5% випадків. Зафіксовані наступні зміни каріотипу: 4,5% - регулярна дисомія по X-хромосомі (с.Кляйнфельтера, каріотип 47,XXY); 0,72% - Робертсонівські транслокації; 0,39% - структурні аномалії Y-хромосоми; 0,34% - збалансовані реципрокні транслокації; 0,3% - різні чисельні аномалії статевих хромосом; 0,15% - додаткові маркерні хромосоми; 0,1% - каріотип 46,XX при чоловічому фенотипі; 0,06% - мозаїчні форми с.Кляйнфельтера; 0,04% - інверсія аутосом та гоносом; 0,23% - інші чисельні та структурні аномалії хромосом [6, 8]. Зміни каріотипу у чоловіків в багатьох випадках супроводжуються азоо- чи важкою олігозооспермією [9-11]. Синдром Кляйнфельтера є найпоширенішим (каріотип 47,XXY, частота 1:1000 новонароджених хлопчиків).

Другим типом гоносомної анеуплоїдії є полісомія по Y-хромосомі. Вона зустрічається серед чоловіків найчастіше у вигляді дисомії (каріотип 47,XY<sub>2</sub> з частотою 0,75-2:1000 новонароджених хлопчиків). Більш ніж у 30% осіб з таким каріотипом спостерігаються порушення репродуктивної функції [12]. Структурні перебудови Y-хромосоми зустрічаються рідше [13]. Транслокації між Y- та X-хромосомами є рідкісним типом хромосомних перебудов і в більшості випадків відбуваються в ділянках високого ступеня X-Y-гомології. Найчастіше відбуваються транслокації між локусами Xp22.3 та Yq11.2 або Xp22.3 та Yp11.3 [цит. по 14]. У випадках транслокації частини хромосоми Y на X пацієнти частіше всього мають чоловічий фенотип і страждають непліддям, зокрема азооспермією. Найбільш поширеними каріотипами при таких перебудовах є: 46, Y, der(X), t(X;Y) (p22.3; q11); 46, X, der(X), t(X;Y) (p22.3; q11) [15].

Серед хромосомних перебудов, які приводять до непліддя у обидвох статей, особливе значення мають Робертсонівські транслокації (РТ). Частота РТ є 1:1000 осіб і є найпоширенішою збалансованою перебудовою. Найчастіше зустрічаються rob(13q;14q) та rob(14q;21q) - 76% та 10% відповідно [16]. Подружні пари з носійством такої перебудови входять до групи ризику по народженню дітей з хромосомними аномаліями та уніпарентними дисоміями, самовільними викиднями та непліддям. Робертсонівські транслокації розглядаються як одна з основних причин спонтанного переривання вагітності [17]. Цікавим є факт, що у чоловіків-носіїв РТ первинне непліддя спостерігається частіше, ніж у жінок-носіїв.

Отже, кількісні та структурні аномалії хромосом є вагомими причинами порушення репродуктивної функції у людини. Вивчення хромосомних аномалій цитогенетичними методами дозволяє встановити питому вагу різних типів змін каріотипу серед пацієнтів з непліддям.

#### Матеріали та методи дослідження

Цитогенетичні дослідження виконували на культурах лімфоцитів периферійної крові. Культивування проводили напівмікрометодом за стандартною методикою [18] з деякими модифікаціями. Зупинку мітозу проводили шляхом додавання 0,5мкг/мл колхіцину на 66-68 год. культивування. З метою отримання якісних середньомітотичних та ранньомітотичних хромосом одночасно з колхіцином вводили бромистий етидій в концентрації 10 мкг/мл. Препарати витримували до наступного дня в термостаті при +65°C та забарвлювали GTG- або CBG-методами [19, 20]. Стандартно аналізували по 20-25 метафазних пластин задовільної якості із кількістю 550-800 бендів на гаплоїдний набір згідно I SCN 2005 [4]. При підозрі на мозаїцизм аналіз проводили згідно загальноприйнятими нормам [4, 19, 20].

#### Отримані результати та їх обговорення

Викладені результати цитогенетичних досліджень 56 пар з первинним непліддям (ПН) та 72 пари з вторинним непліддям (ВІ) в анамнезі, які звернулись до Львівського ММГЦ протягом 2007-2008 років. Частота порушень каріотипу викладена в таблиці 1.

Таблиця 1

**Результати каріотипування подружніх пар з  
неплідністю в абсолютних числах та відсотках**

Тип непліддя	Стать	Кількість цитогенетичних обстежень	Зміни каріотипу
первинне	жінки	56	2(3,5%)
вторинне	жінки	72	5(6,9%)
первинне	чоловіки	56	4(7,1%)
вторинне	чоловіки	72	2(2,8%)
первинне+вторинне	жінки	128	7(5,47%)
первинне+вторинне	чоловіки	128	6(4,81%)

Загальна частота змін каріотипу серед неплодних осіб скла-  
ла 5,08%. Слід наголосити, що серед жінок з ВН в анамнезі  
носії чисельних та структурних перебудов хромосом зустрі-  
чалися частіше, ніж серед жінок з ПН. Серед чоловіків зафік-  
сований зворотній процес. При первинному неплодді хромо-  
сомні зміни у чоловіків спостерігали вдвічі частіше, ніж у  
жінок. І навпаки, частота порушень каріотипу серед жінок з  
ВН є значно вищою від аналогічного показника серед чоловіків.

Спектр виявлених чисельних та структурних аномалій на-  
ведений в таблицях 2 та 3. Аналіз відхилень каріотипу пока-  
зує наступне: 1) чисельні анеуплодії по Х-хромосомі, включа-  
ючи мозаїчні форми - 4 вип. (30,8%); 2) Робертсонівські транс-  
локації - 4 вип. (30,8%); 3) Х-аутосомні транслокації - 1 вип.  
(7,7%); 4) транслокації між аутосомами - 3 вип. (23%); 5)  
інверсії - 1 вип. (7,7%).

Отже, основний внесок у виникнення непліддя "хромосом-  
ного" генезу складають чисельні анеуплодії гоносом та ро-  
бертсонівські транслокації - більше 61%. Слід вказати, що,  
на відміну від чоловіків, серед жінок випадки гоносомної ане-  
уплодії зафіксовані виключно в мозаїчній формі. Роберт-  
сонівські транслокації у всіх випадках встановлені як  
der(13;14). Вони становлять 50% всіх аномалій каріотипу та  
75% аутосомних перебудов, виявлених у чоловіків з непліддям.  
В структурі жіночого непліддя "хромосомного" генезу ос-  
новна частка належить збалансованим аутосомним трансло-

каціям - 43%, причому Робертсонівські транслокації склада-  
ють лише третину серед цих аномалій та 14% всіх аномалій  
каріотипу. Цікавим є факт, що у всіх виявлених випадках зба-  
лансованих аутосомних транслокацій задіяні хромосоми 10 та/  
або 13 з однаковими районами перебудов.

Таблиця 2

**Зміни каріотипу у жінок з неплодністю**

№ п/п	Зміни каріотипу	Кількість випадків
1	46,XX [24]/47,XXX [3]	1
2	46,X,dup(X)(q28q12) [27]/ 45,X[3]	1
3	46,XX,t(X;4)(q28;q31.2)	1
4	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	1
5	46,XX,t(8;13)(q22.3;q14.3)	1
6	46,XX,t(10;13)(q26.3;q14.3)	1
7	46,XX,inv16(p11.2q13)	1

Таблиця 3

**Зміни каріотипу у чоловіків з неплодністю**

№ п/п	Зміни каріотипу	Кількість випадків
1	47,XXY	2
2	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	3
3	46,XY,t(7;10)(p21.2;q26.13)	1

Слід наголосити, що серед подружніх пар з ПН найчастіше  
спостерігали чисельні анеуплодії Х-хромосоми - 50% та РТ -  
33%. Робертсонівські транслокації спостерігали виключно у  
чоловіків. Це співпадає з висновками інших дослідників [3]  
про важчі наслідки РТ для репродуктивної функції осіб чоло-  
вічої статі.

Серед подружніх пар з вторинним непліддям в анамнезі не  
виявили чисельних аномалій гоносом у чоловіків, а серед  
жінок зафіксована тільки мозаїчна форма трисомії по Х-хро-  
мосомі з перевагою нормального клону. Основний внесок в  
"хромосомну" етіологію вторинного непліддя вклали збалан-  
совані транслокації аутосом - 71,4%. Робертсонівські транс-  
локації склали 28,6% від усіх виявлених змін каріотипу та  
зустрічались у осіб обох статей.

**Висновки**

1. Загальна частота змін каріотипу серед неплідних пар становить 5,08%. Основний внесок у виникнення непліддя "хромосомного" генезу складають чисельні анеуплоїдії гоносом та робертсонівські транслокації - більше 61%.

2. Серед подружніх пар з первинним непліддям зміни каріотипу зустрічаються у 5,3% випадків, причому частота носійства хромосомних змін серед чоловіків є вдвічі вищою, ніж серед жінок - 7,1% та 3,5% відповідно. Основну долю складають чисельні анеуплоїдії Х-хромосоми - 50% та робертсонівські транслокації - 33%.

3. Чисельні та структурні зміни хромосом встановлені у 4,8% пар з вторинним непліддям в анамнезі. На відміну від осіб з ПН порушення каріотипу у жінок з ВН зустрічаються частіше, ніж у чоловіків - 6,9% проти 2,8% відповідно. Основний внесок вкладають збалансовані транслокації аутосом - 71,4%.

4. Робертсонівські транслокації зафіксовані виключно як der(13;14) та складають 28,6% від усіх виявлених змін каріотипу. У чоловіків з непліддям вони становлять 50% всіх виявлених аномалій каріотипу та 75% аутосомних перебудов. Це підтверджує тезу про винятковий вплив таких транслокацій на репродукційну функцію чоловіків.

5. Отримані результати свідчать про вагомий внесок змін каріотипу у виникненні непліддя, як первинного, так і вторинного.

**Література**

1. *Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counseling prior to intracytoplasmic sperm injection* / Mau U., Baskert I., Kaiser P. e.a. // *Hum.Reprod.* - 1997. - V. 12. - P.930-937.

2. *Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ISCI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men* / Gekas J., Thepot F., Turleau C. et al // *Hum.Reprod.* - 2001. - V.16. - P.82-90.

3. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. *Цитогенетика эмбрионального развития.*-Санкт-Петербург: Н-Л. - 2007. - 639 с.

4. *ISCN (2005): An International System for Human*

*Cytogenetic Nomenclature* // Shaffer L.G., Tommerup N.(eds). Karger; Basel, 2005. - 131 p.

5. *Идентификация кольцевой и маркерной хромосом при типичных формах дисгенезии гонад (случай из практики)* / Глинькина Ж.И., Дзенис И.Г., Леонов Б.В., Мушакоева Г.И., Бахарев В.А. // *Пробл. репрод.* - 2001. - № 1. - С.57-59.

6. *Randolf L.M. Cytogenetics of Infertility. Prenatal cytogenetics / In: The principles of clinical cytogenetics* // Eds.Gersen S.L., Keagle M.B.- Human Press.-Totowa.-New Jersey.-USA.-2005.-P.247-265.-P.267-321.

7. Ворсанова С.Г., Юров В.Б., Чернышов В.Н. *Медицинская цитогенетика.* - М.: Медпрактика, 2006. - 299 с.

8. *De Braekeleer M., Dao T-N. Cytogenetic studies in male infertility: a review* // *Hum.Reprod.* - 1991. - V.6. - P.245-250.

9. *Yoshida A., Kazukiyo M., Shirai M. Chromosome abnormalities and male infertility* // *Assist.Reprod.Rev.* - 1995. - V. 6. - P.93-99.

10. *Reproductive genetic counseling in non mosaic 47,XXY patients: implications for preimplantation or prenatal diagnosis. Case report and review* / Tachdian G., Frydman N., Morichon-Delvallez N. e.a. // *Hum.Reprod.* - 2003. - V. 18. - P. 271-275.

11. *Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection influence implantation and ongoing pregnancy rates* / Scholtes M., Behrend C., Dierzel-Dahmen J. et al // *Fertil.Steril.* - 1998. - V.70. - P.933-937.

12. *Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции* / Ворсанова С.Г., Берешева А.К., Кананцева Л.З. и др. // *Пробл. репрод.* - 1998. - Т.6.-С.41-46.

13. *Структура наследственной патологии половой системы при исследовании пациентов с нарушением репродукции* / Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Мхитарова О.В. и др. // *Инвалид.наследственных болезней: Тез.конф.* - Москва: МГНЦ РАМН. - 1997. - С. 84

14. Черных В.Б. *Макро-и микроструктурные перестройки Y-хромосомы* // *Мед.генетика.* - 2007. - Т.6, № 10. - С.45-52.

15. Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф. Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин // Пробл. репрод. - 1998. - № 2. - С. 80-82.

16. Молекулярно-цитогенетическое исследование робрертсоновской транслокации 13;14 и синдрома Дауна у ребенка 3 лет / Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Монахов В.В., Берешева А.К., Соловьев И.В., Юров В.Б. // Цитология и генетика. - 2004. - № 6. - С.54-59.

17. Kim S-R., Shaffer L.G. Robertsonian translocations: mechanism of formation aneuploidy and uniparental disomy and diagnostic considerations // Genet. Testing. - 2002. - V.6. - P.163-168.

18. Hungerford D.A. Leucocytes culture from smoll inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain. Technol. - 1965. - V.40, № 6. - P. 333-338.

19. Хромосомы человека. Атлас. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. - Москва: Медицина, 1982. - 263 с.

20. Зерова-Любимова Т.Е., Горовенко Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини. Методичні рекомендації. - Київ, 2003. - 23 с.

#### Резюме

Гулеюк Н.Л., Гуменецкий И.Е., Заставна Д.В., Гельнер Н.В., Биль И.А. Результаты цитогенетических исследований подружних пар с первичным та вторичным бесплодием.

Виконані цитогенетичні дослідження у 128 подружніх пар з первинним та вторинним бесплодием в анамнезі. Зміни кариотипу виявлені у 5,08%. Серед чоловіків з первинним бесплодием аномалії хромосом зустрічались вдвічі частіше, ніж серед жінок. При вторинному бесплодді, навпаки, зміни хромосом переважали серед жінок. Більше 61% порушень кариотипу - чисельні анеуплоїдії Х-хромосоми та робрертсонівські транслокації. Робрертсонівські транслокації зафіксовані виключно як der(13;14). В групі бесплодних чоловіків ці транслокації склали 50% усіх змін кариотипу та 75% аутомсомних перебудов. Це підтверджує тезу про винятковий вплив робрертсонівських транслокацій на репродукційну функцію чоловіків. У всіх занотованих випадках збалансованих аутомсомних транслокацій задіяні хромосоми 10 та/або 13 з однаковими районами перебудов.

**Ключові слова:** бесплодие, хромосоми, збалансовані транслокації, робрертсонівські транслокації, гоносомні анеуплоїдії.

#### Резюме

Гулеюк Н.Л., Гуменецкий И.Е., Заставная Д.В., Гельнер Н.В., Биль И.А. Результаты цитогенетических исследований супругов с первичным и вторичным бесплодием.

Проведены цитогенетические исследования у 128 супружеских пар с первичным и вторичным бесплодием в анамнезе. Изменения кариотипа установлены у 5,08%. Среди мужчин с первичным бесплодием аномалии хромосом встречались вдвое чаще, чем у женщин. При вторичном бесплодии, наоборот, изменения хромосом преобладали среди женщин. Более 61% нарушений кариотипа - числовые анеуплоидии Х-хромосоми и робрертсоновские транслокации. Робрертсонівські транслокації зафіксовані виключительно как der(13;14). В группе бесплодных мужчин эти транслокации составили 50% всех изменений кариотипа и 75% аутомсомных перестроек. Это подтверждает тезис о исключительном влиянии робрертсоновских транслокаций на репродуктивную функцию у мужчин. Во всех зафиксированных случаях сбалансированных аутомсомных транслокаций задействованы хромосоми 10 и/или 13 с идентичными районами перестроек.

**Ключевые слова:** бесплодие, хромосоми, сбалансированные транслокации, робрертсоновские транслокації, гоносомные анеуплоидии.

#### Summary

Huleyuk N.L., Gumenetskyj I.E., Zastavna D.V., Helner N.V., Bil I.A. Results of cytogenetic investigations of couples with primary and secondary infertility.

Investigation of 128 married couples with primary or secondary infertility in anamnesis was performed. Changes in the karyotype were detected in 5.08% of cases. Men with primary infertility had twice the number of chromosome anomalies than women. On the contrary, individuals with secondary infertility were mostly women. More than 61% of karyotype anomalies were numerical aneuploidies of X-chromosome and Robertsonian translocations, that were present solely as der(13;14). Within the group of infertile males, such translocations were present in 50% of all karyotype aberrations and in 75% of autosome alterations. This supports the thesis about exceptional influence of Robertsonian translocations on male reproduction function. In all noted cases of balanced autosomal translocations, the chromosomes 10 and/or 13 were involved with same regions of translocations.

**Key words:** infertility, chromosomes, balanced translocations, robertsonian translocations, gonosomal aneuploidies.