

ТКАЧ І.Р.¹, ГУЛЕЮК Н.Л.¹, ГЕЛЬНЕР Н.В.¹, БЕЗКОРОВАЙНА Г.М.¹, ВАЙСЕ А.², КОСЯКОВА Н.², ЛІР Т.², ФЕДИШИН Т.В.³

¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: tkach.iryua.ihp@gmail.com

² Госпіталь університету Йєни, Університет Фрідріха Шіллера, Інститут генетики людини, Німеччина, D-07743, Йєна, Колегінгассе, 10

³ ДВНЗ «Ужгородський національний університет»,

Україна, 88000, Закарпатська обл., м. Ужгород, пл. Народна, 3

СПЕКТР ТА ЧАСТОТА ЧИСЛЕННИХ ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ В МАТЕРІАЛІ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ

Цитогенетичне дослідження є важливою складовою у встановленні етіології ранніх репродуктивних втрат (РРВ) у людини. Відомо, що серед причин мимовільного переривання вагітності, особливо в першому триместрі, перше місце посідають аномалії каріотипу — 60–80%: поліплоїдія, анеуплоїдія по аутозомам та статевих хромосомах та ін. Вважається, що частота хромосомних аномалій обернено пропорційна вагітностям, що розвиваються [1, 2]. Така велика кількість запліднень із хромосомним дисбалансом обумовлена високою частотою численних хромосомних аномалій у статевих клітинах людини: 1–2% в сперматозоїдах, в ооцитах — біля 20% [3, 4]. Частота анеуплоїдій у матеріалі мимовільних викиднів знижується із зростанням терміну вагітності, а серед мертвороджених плодів складає 4%, серед живонароджених — лише 0,3% [5].

Структура порушень каріотипу при репродуктивних втратах стабільна, а спектр хромосомних аномалій (ХА) у спонтанних викиднів (СВ) істотно відрізняється від спектру у новонароджених. Найвищий відсоток ХА у матеріалі СВ становлять трисомії (50–60%, згідно з даними деяких авторів — до 96%), з них трисомія 16–15–20%, поліплоїдії — 20–25%, моносомії — 10–15%, структурні аномалії — 5–6% [6, 7]. Найчастіше у мимовільних викиднів спостерігають трисомії хромосом 16, 22, 21, 15, 13, 18, зазначених в порядку спадання [8]. Серед хромосом групи С найвищий відсоток трисомій 7, 8, 9, які зустрічаються виключно у матеріалі РРВ. Це свідчить про сублетальний ефект надлишку цього генетичного матеріалу. На післяімплантаційних стадіях розвитку не реєструють випадків трисомій хромосом 1 і 19 [9, 10]. У матеріалі вагітностей, втрачених до 10-го тижня розвитку, достатньо висока частота подвійних і потрійних

трисомій. Такі трисомії, незалежно від задіяних хромосом, у більшості випадків є летальними.

Єдина форма повної моносомії, яка сумісна з внутрішньоутробним та постнатальним розвитком, — моносомія X. Ця хромосомна патологія найчастіше зустрічається у матеріалі РРВ — у 10–15% випадків. Походження гоносомної моносомії є предметом дискусії, оскільки у певних дослідженнях її виникнення пов'язують із віком жінки > 38 років, в інших — з помилками під час мейотичного поділу у статевих клітинах батька [2, 11].

Поліплоїдія сумісна з внутрішньоутробним розвитком у людини лише у вигляді триплоїдії 69, XXX і 69, XXУ, що зустрічаються у 5,7%, та тетраплоїдії — 2,39%. Майже кожен 10-й самовільний абортус є триплоїдним [12].

Значна частина зачатъ з анеуплоїдіями, які зустрічаються у народжених дітей, гине ще в антенатальному періоді (до 99% при гоносомній моносомії, 30–70% при трисоміях 13, 18 і 21). Згідно з міжнародними зведеннями, в період від 10-го тижня вагітності до пологів елімінується приблизно половина зачатъ з трисомією 21 (синдром Дауна), більше 80% з трисомією 18 (синдром Едвардса), більше 60% з трисомією 13 (синдром Патау) і приблизно 30% плодів з моносомією X (синдром Шерешевського-Тернера) [12]. Вважають, що на життєздатність плоду впливає форма хромосомного дисбалансу. Існує гіпотеза, що анеуплоїдія у всіх клітинах зародка провокує антенатальну загибель, а наявність мозаїчного каріотипу з клоном клітин із нормальним набором хромосом підвищує шанс народження дитини [19]. Непрямим підтвердженням цього припущення є підвищена частота мозаїків X/XX і X/XY серед новонароджених порівняно з частотою серед мимовільних викиднів [11, 13, 14]. Разом з тим, мозаїчна форма гетероплоїдії, виявлена

тільки в плаценті, може бути причиною втрати вагітності [12].

Отже, хромосомні порушення є вагомою причиною мимовільного переривання вагітності, особливо у ранньому терміні. Тому цитогенетичний аналіз матеріалу ранніх репродуктивних втрат із акцентом на структуру порушень каріотипу залежно від терміну загибелі ембріона чи плоду дуже актуальний і є метою цього дослідження.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували ворсини хоріону (ВХ), отримані внаслідок раннього мимовільного переривання вагітності (до 14 тижнів гестаційного розвитку). Ворсини відбирали під бінокулярною лупою із збільшенням $\times 40$. ВХ відмивали розчином HBSS або PBS та проводили подальшу обробку залежно від методу дослідження — стандартного цитогенетичного чи молекулярно-цитогенетичного. Приготування препаратів хромосом з ворсин хоріону виконували «прямим» методом [15] з деякими модифікаціями. Мацерацію ворсин проводили в 60% оцтовій кислоті. Для виконання стандартного цитогенетичного аналізу препарати витримували до наступного дня в термостаті при $+65^{\circ}\text{C}$ та забарвлювали GTG- або CBG-методами. За допомогою світлового мікроскопа (Zeiss, Axioscope; Jena, Germany) аналізували мінімум 10 метафазних пластин задовільної якості при збільшенні $\times 1000$.

Молекулярно-цитогенетичні дослідження із застосуванням інтерфазного FISH (iFISH) забарвлення [16] виконували із застосуванням таких наборів центромерних зондів:

набір 1: центромерні проби для 13p11.1-q11.1 і 21p11.1-q11.1 (D13/21Z1, помічений SpectrumGreen = SG), 15q11 (D15Z3 помічений Texasred = TR) і 18p11.1-q11.1 (D18Z1 помічений — Diethylaminocoumarin = DEAC);

набір 2: центромерні проби для 14p11.1-q11.1 і 22p11.1-q11.1 (D14/22Z1 помічений SpectrumGreen = SG) і 16p11.1-q11.1 (D16Z2 помічений TR);

набір 3: центромерні проби для 17p11.1-q11.1 (D17Z1 помічений SpectrumOrange = SO), Xp11.1-q11.1 (DXZ1 помічений DEAC) і Yq12 (DYZ1 помічений SG).

Отримані препарати вивчали за допомогою мікроскопа AxioPlan II (Carl Zeiss Jena GmbH) з

набором флюоросцентних фільтрів DAPI, FITC, TR, Cy3 і Cy5. Зображення 100 і більше інтерфазних ядер на один зразок аналізували з використанням програмного забезпечення Isis DGTSA, BGR-I і DGSoSa (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlussheim, Germany).

Результати та обговорення

Усього обстежили 218 зразків ВХ, отриманих внаслідок раннього переривання вагітності. Спочатку всі зразки аналізували стандартним цитогенетичним методом. За відсутності метафазних пластин, що унеможливило отримання результату за допомогою цього методу, матеріал готували для проведення молекулярно-генетичного дослідження. Для iFISH відібрали мітки по хромосомах, анеуплоїдії по яких, згідно з літературними джерелами, найчастіше зустрічаються при ранніх репродуктивних втратах. Враховували численні геномні зміни — триплоїдії та тетраплоїдії — і хромосомні анеуплоїдії — триплоїдії та моносомії. За нормальний вважали каріотип, у якому не фіксували патологій за допомогою стандартного цитогенетичного аналізу, а при молекулярно-цитогенетичному дослідженні були відсутні анеуплоїдії по хромосомах 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y.

Серед проаналізованих 218 зразків нормальний каріотип зафіксували у 148 (67,9%), геномні та численні хромосомні зміни — у 75 (32,1%). Серед цитогенетичних відхилень спостерігали поліплоїдії (триплоїдії та тетраплоїдії) — 12,4% випадків, гоносомні анеуплоїдії (моносомія X, трисомія X, мозаїцизм) — 6,4%, аутосомні анеуплоїдії — 13,3%. Серед поліплоїдій переважала триплоїдія (11,9%), серед гоносомних анеуплоїдій — моносомія X (4,6%), аутосомних анеуплоїдій — трисомія 16 (6,4%). Отримані результати співзвучні з даними багаточисленних досліджень [2, 6–8, 12].

Залежно від терміну втрати вагітності дані цитогенетичних досліджень розподілили на три групи — до 6-ти тижнів гестаційного терміну (перша група), 6–10 тижнів (друга група), більше 11-ти тижнів (третья група) (табл., рис.). Найвищий відсоток хромосомної патології — 37% — зафіксували у другій групі, найнижчий — у третій — 21%. Поліплоїдію спостерігали у всіх групах, але з різною частотою — від 17% у третій групі до 14% у першій та 11% у другій (рис.). У другій та третій групах поліплоїдію фіксували

Таблиця

Розподіл результатів цитогенетичних досліджень залежно від терміну мимовільного переривання вагітності

Менше 6 тижнів		6–10 тижнів		Більше 11 тижнів		Всього випадків, <i>n</i>
каріотип	<i>n</i>	каріотип	<i>n</i>	каріотип	<i>n</i>	
триплоїдія	5	триплоїдія	17	триплоїдія	4	26
тетраплоїдія	1	—		—		1
трисомія 16	5	трисомія 16	8	трисомія 16	1	14
—		моносомія X	10	—		10
—		трисомія X	1	—		1
моносомія X [40]/трисомія X [60]	1	—		—		1
—		дисомія X [23]/моносомія X [77]	1	—		1
—		дисомія X [4]/моносомія X [96]	1	—		1
47, XXУ	1	—		—		1
—		трисомія 3	1	—		1
—		трисомія 14	1	—		1
—		трисомія 15	4	—		4
—		моносомія 15 [61]/дисомія 15 [39]	1	—		1
—		трисомія 18	2	—		2
—		трисомія 20	2	—		2
—		трисомія 21	4	—		4
трисомія 22	1	трисомія 22	2	—		3
		моносомія 22 [26]/дисомія 22 [23]/трисомія 22 [51]	1			1
Всього патологій, <i>n</i>	14		56		5	75
Каріотип без змін, <i>n</i>	30		95		18	143
Всього випадків, <i>n</i>	44		151		23	218

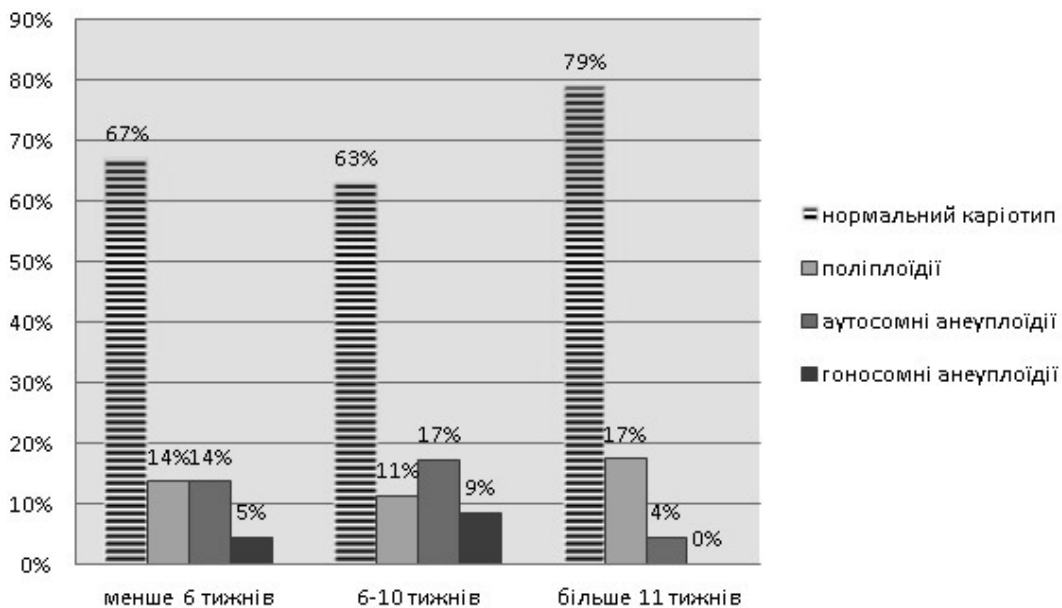
Примітка: *n* — абсолютні числа.

Рис. Розподіл хромосомних аномалій матеріалу репродуктивних втрат залежно від терміну мимовільного переривання вагітності

виключно у вигляді триплоїдії. Єдиний випадок тетраплоїдії виявили у матеріалі вагітності, яка перервалася у терміні до 6-ти тижнів. Це збігається із висновком інших досліджень, що поліплоїдія сумісна виключно з внутрішньоутробним розвитком і тільки у вигляді три- та тетраплоїдії [12].

Гоносомні анеуплоїдії зафіксували тільки у другій — 9% та першій — 5% групах, причому переважала моносомія X у чистій та мозаїчній формах.

Для другої групи притаманний вищий відсоток аутосомних змін — 17%, порівняно із 14% у першій групі та 4% у третій, та ширший спектр порушень, а саме наявність трисомій хромосом 3, 14, 15, 18, 20 та 21, які не зустрічалися в інших групах (табл.).

Отже, цитогенетичні дослідження є важливим елементом встановлення причини ранніх репродуктивних втрат. Частота та спектр геномних та хромосомних порушень змінюється залежно від гестаційного терміну втраченої вагітності.

ЛІТЕРАТУРА

- Stephenson M., Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss // *Clin Obstet Gynecol.* — 2007. — 50, N 1. — P. 132–145.
- Simpson J.L. Causes of fetal wastage // *Clin Obstet Gynecol.* — 2007. — 50, N 1. — P. 10–30.
- Nagaishi M., Yamamoto T., Iinuma K., Shimomura K., Berend S.A., Knops J. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan // *J Obstet Gynaecol Res.* — 2004. — 30. — P. 237–241.
- Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage // *Lancet.* — 2006. — 368, № 9535. — P. 601–611.
- Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genetics of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* — 2001. — 2. — P. 280–291.
- Goddijn M.M., Leschot N.J. Genetic aspects of miscarriage // *Clinical Obstetrics and Gynaecology.* — 2000. — 14. — P. 855–865.
- Бочков Н. П. Клиническая генетика. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 448 с.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Soloviev I.V., Demidova I.A., Alexandrov I.A., Sharonin V.O., Beresheva A.K. Original collection of DNA probes for preimplantational, fetal prenatal and postnatal diagnosis of chromosomal analysis by FISH // *In Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in Mother. Present State and Perspectives.* Edited by: Macek M Sr, Bianchi D, Cuckle H. — Prague: The Karolinum Press. — 2002. — P. 275–283.
- Philipp T., Kalousek D.K. Transcervical embryology in missed abortion // *Journal of assisted reproduction and genetics.* — 2001–18, N 5. — P. 285–289.
- Philipp T., Philipp K., Reiner A., Beer F., Kalousek D.K. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies // *Hum. Reprod.* — 2003. — 18, N 8. — P. 1724–1732.
- Werner M., Reh A., Grifo J., Perle M.A. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population // *J Assist Reprod Genet.* — Aug 2012. — 29, N 8. — P. 817–820.
- Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. — С-П.: Н-Л, 2007. — 640 с.
- Held K.R., Kerber S., Kaminsky E., Singh S., Goetz P., Seemanova E., Goedde H.W. Mosaicism in 45, X Turner syndrome does survival in early pregnancy depends on the two sex chromosomes? // *Hum. Genet.* — 1992. — 88, N 3. — P. 288–294.
- Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Iourov I.Y., Monakhov V.V., Kirillova E.A., Soloviev I.V., Yurov Y.B. Evidence for High Frequency of Chromosomal Mosaicism in Spontaneous Abortions Revealed by Interphase FISH Analysis // *J. Histochem Cytochem.* — 2005. — 53. — P. 375–380.

Висновки

1. Відсоток геномних та численних хромосомних змін у матеріалі РРВ є значним — 32,1%, структура яких складається з поліплоїдії — 12,4%, гоносомні анеуплоїдії — 6,4% та аутосомні анеуплоїдії — 13,3%.

2. Найвищий відсоток хромосомної патології — 37% — зафіксували у матеріалі вагітностей, втрачених протягом 6–10 тижнів гестаційного розвитку, найнижчий — 21% — більше 11-ти тижнів.

3. Аутосомні порушення складають основну частину структури хромосомних аномалій у матеріалі РРВ в терміні 6–10 тижнів гестаційного розвитку.

Робота частково профінансована West-Ukrainian BioMedical Research Center grant (17-th WUBMRC (2013–2014)).

Автори публікації висловлюють подяку колективу молекулярно-цитогенетичної лабораторії Institute of Human Genetics, University Hospital, Friedrich Schiller University, Germany, Jena у сприянні проведенню досліджень.

15. Баранов В. С. Метод стряхивания-отпечатывания — простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хориона // Цитология. — 1989. — 31, № 2. — С. 251–253.
16. Liehr T., Pellestor F. Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure. — Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide. Liehr T, editor. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009. — P. 23–34.

TKACH I.R.¹, HULEYUK N.L.¹, HELNER N.V.¹, BEZKOROVAINA H.M.¹, WEISE A.², KOSYAKOVA N.², LIEHR T.², FEDYSHYN T.V.³

¹ State Institution «Institute of Hereditary Pathology NAMS of Ukraine», Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a

² Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Germany, D-07743, Jena, Kollegiengasse, 10

³ State University «Uzhhorod National University», Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Ukraine, 88000, Transcarpathian region, Uzhhorod, Narodna Square, 3

SPECTRUM AND FREQUENCY OF NUMERICAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN MATERIAL OF EARLY REPRODUCTIVE LOSS

Aim. The determination spectrum and frequency of chromosomal abnormalities in samples from early reproductive losses depending on term of gestation. **Methods.** Banding cytogenetic and interphase mFISH analysis. **Results.** Cytogenetic and molecular-cytogenetic investigations was performed on 218 samples of early reproductive loss. Normal karyotype detected in 148 cases (67.9%), abnormal karyotype in 75 cases (32.1%). The highest percentage of chromosomal abnormalities — 37% — recorded in the material pregnancies lost for 6–10 weeks of gestation. **Conclusion.** Cytogenetic studies are an important element of determine the cause of early reproductive losses. The frequency and spectrum of genomic and chromosomal abnormalities varies depending on the gestational term of the lost pregnancy.

Keywords: early reproductive loss, chromosome abnormalities, cytogenetics, mFISH.