

ТКАЧ І.Р.<sup>1</sup>✉, ГУЛЕЮК Н.Л.<sup>1</sup>, ЗАСТАВНА Д.В.<sup>1</sup>, БЕЗКОРОВАЙНА Г.М.<sup>1</sup>, ФЕДИШИН Т.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

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

<sup>2</sup> ДВНЗ «Ужгородський національний університет»,

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

✉tkach.iryua.ihp@gmail.com, (097) 986-48-20

## ВНЕСОК ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ У ГЕНЕЗ СПОРАДИЧНИХ ТА ЗВИКЛИХ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ

Втрата вагітності – одна з найпоширеніших проблем сучасної репродуктології. Вважається, що 15–25 % вагітностей закінчуються самовільним викиднем у першому триместрі [1]. Невиношування вагітності має велике соціальне та медичне значення, оскільки має негативний вплив на показники пренатальних втрат, які визначають демографічну ситуацію

Встановлення причини невіношування вагітності – важливе і важке завдання. Загалом приблизно 25 % жінок втрачали принаймні одну вагітність. Це окреслюється поняттям спорадичні репродуктивні втрати (СРВ) [2]. Генетичні порушення, особливо хромосомні аномалії, є найчастішою причиною спонтанних викиднів у першому триместрі вагітності. Хромосомні аномалії трапляються приблизно у 60 % випадків [3]. Серед СРВ більшість хромосомних аномалій (95 %) є чисельними: трисомії по аутосомних хромосомах (60 %), моносомія по Х-хромосомі (20 %) та інші, 15 % припадає на поліплоїдії, а саме триплоїдії [4.] У випадку чисельних хромосомних аберацій у плода батьківський хромосомний набір, як правило, нормальний. Окрім чисельних хромосомних змін, можуть бути і структурні перебудови, які призводять до втрати вагітності.

Звичкі репродуктивні втрати (ЗРВ) – втрата трьох і більше вагітностей [5]. ЗРВ спостерігаються у 1–8 % жінок репродуктивного віку [6]. Серед можливих передумов ЗРВ є генетичні аномалії у батьків чи у плода, антифосфоліпідний синдром, анатомічні та ендокринні фактори, успадковані тромбофілії та імунні фактори [7]. У 50 % випадків причина ЗРВ є не встановленою [8] і окреслюється поняттям «ідопатичне звичне невіношування вагітності» [5]. Внесок хромосомних аномалій у матеріалі ранніх репродуктивних втрат у генез ЗРВ однозначно не окреслений. За даними деяких дослі-

джень [9, 10], частота хромосомних аномалій становить 51–60 %, за іншими даними [11, 12] – 5–29 %. Припускається, що зі збільшенням кількості втрачених вагітностей у жінки імовірність наявності хромосомної аномалії в плоду зменшується.

Метою дослідження було вивчення чисельних хромосомних аномалій у матеріалі ранніх репродуктивних втрат при спорадичному та звичному невіношуванні вагітності. Ця інформація має важливе значення при медико-генетичному консультуванні пар із СРВ та ЗРВ з метою прогнозування ризику повторних репродуктивних втрат.

### 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 х40. ВХ відмивали розчином HBSS або PBS та проводили подальшу обробку залежно від методу дослідження – стандартного цитогенетичного чи молекулярно-цитогенетичного. Приготування препаратів хромосом із ворсин хоріону виконували «прямым» методом [13] з деякими модифікаціями. Мацерацію ворсин проводили в 60 % оцтової кислоти. Для виконання стандартного цитогенетичного аналізу препарати витримували до наступного дня в термостаті при +65°C та забарвлювали GTG- або CBG-методами. За допомогою світлового мікроскопа (Zeiss, Axioscope; Jena, Germany) аналізували мінімум 10 метафазних пластин задовільної якості при збільшенні х1000.

Молекулярно-цитогенетичні дослідження виконували із застосуванням зондів на хромосоми, які найчастіше трапляються у матеріалі ранніх репродуктивних втрат. Використовували

метод інтерфазного FISH (iFISH) забарвлення [14] із застосуванням таких наборів центромерних зондів:

набір 1: центромерні проби для 13p11.1-q11 і 21p11.1-q11.1 (D13/21Z1, помічений SpectrumGreen = SG), 15q11 (D15Z3 помічений Texas-red = 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 SerctrumOrange = SO) і Xp11.1-q11.1 (DXZ1 помічений DEAC), і Yq12 (DYZ1 помічений SG).

У випадках детекції 5 сигналів 13/21 додатково проводився iFISH з набором ВАС міток:

- 13q14.11 (RP11-2P5 помічений SG);
- 21q11.2 (RP11-89H21 помічений TR);
- 21q21.1 (RP11-973L24 помічений DEAC).

У випадках із 5 сигналами 14/22 проводили iFISH з міткою до 22p11.2 (D22Z4 помічений SG).

Отримані препарати вивчали за допомогою мікроскопа Ахіоплан II (Carl Zeiss Jena GmbH) з набором флюоросцентних фільтрів DAPI, FITC, TR, Cy3 і Cy5. Аналізували не менше 100 інтерфазних ядер на один набір від кожного зразка з використанням програмного забезпечення Isis DGTSa, BGR-I і DGSoSa (Meta-Systems Hard & Software GmbH, Altlusheim, Germany).

### Результати та обговорення

Усього обстежено 419 зразків ВХ, отриманих внаслідок раннього переривання вагітності. Всі зразки аналізували стандартним цитогенетичним методом. При відсутності метафазних пластин матеріал готували для проведення молекулярно-цитогенетичного дослідження. Враховували чисельні геномні зміни – триплоїдії та тетраплоїдії і хромосомні анеуплоїдії – трисомії та моносомії. Структурні перебудови та часткові анеуплоїдії не вивчали. За нормальний вважали каріотип, у якому не фіксували патологій за допомогою стандартного цитогенетичного аналізу, а при молекулярно-цитогенетичному дослідженні були відсутні анеуплоїдії за хромосомами 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y.

Серед проаналізованих 419 зразків нормальний каріотип зафіксували у 269 (64,2 %), ге-

номні та чисельні хромосомні зміни – у 150 (35,8 %). Серед цитогенетичних аномалій спостерігали поліплоїдії (триплоїдії та тетраплоїдії) – 30,7 % випадків (включаючи мозаїчні форми), гоносомні анеуплоїдії (моносомія X, трисомія X, мозаїцизм) – 24,7 %, аутосомні анеуплоїдії – 44,6 %. Серед поліплоїдій переважала триплоїдія (27,3 %), серед гоносомних анеуплоїдій – моносомія X у чистій формі (22 %), аутосомних анеуплоїдій – трисомія 16 (18,7 %), трисомія 21 (6,7 %), анеуплоїдія по 15 (6,7 %) та трисомія 22 (5,3 %)

Результати цитогенетичних і молекулярно-цитогенетичних досліджень зразків ВХ були розділені відповідно до анамнестичних даних щодо репродуктивної функції жінки (табл.):

- група I – перша завмерла вагітність, в анамнезі відсутні попередні вагітності і здорові діти;
- група II – в анамнезі репродуктивні втрати і здорові діти;
- група III – в анамнезі ЗРВ.

Дані цитогенетичних досліджень СРВ розділені на дві групи з метою визначення особливостей частоти та спектра хромосомних аномалій залежно від наявності чи відсутності здорового потомства.

Порушення каріотипу у матеріалі втрачених вагітностей при СРВ виявлені в 114/286 (39,9 %): у групі I – 62/155 (40 %) і у групі II – 52/131(39,7 %). При ЗРВ хромосомні аномалії зафіксували лише у 36/133 випадках (27,1 %). Отримані результати збігаються із даними інших дослідників [11, 12].

Лише при СРВ виявили трисомії за хромосомами 3, 13, 14, 18, 20 та 22, а в групі ЗРВ – тетраплоїдію та моносомію за хромосомою 15.

Найчастіше при СРВ спостерігали такі хромосомні аномалії: в групі I – триплоїдія (32,3 %), гоносомна моносомія (22,6 %) та трисомія за хромосомою 16 (14,5 %); в групі II – гоносомна моносомія (23,1 %), трисомія за хромосомою 16 (23,1 %) та триплоїдія (21,2 %). Отже, частота виявлених порушень відрізнялася у групі I та II, а саме: частота триплоїдій вища в групі I в 1,52 раза, а трисомія за хромосомою 16 – вища в групі II в 1,59 раза.

При ЗРВ найчастіше діагностували такі зміни каріотипу: триплоїдія (27,8 %), гоносомна моносомія (22,2 %) та трисомія за хромосомою 16 (19,4 %).

На рис. зображено частоту ключових хромосомних анеуплоїдій у досліджуваних групах.

Таблиця. Результати каріотипування мимовільно елімінованих ембріонів людини

Каріотип	Група I		Група II		Група III		Усі групи разом	
	n	%	n	%	n	%	n	%
нормальний XY	40	25,8	39	29,8	52	39,1	131	31,3
нормальний XX	53	32,4	40	30,5	45	33,8	138	32,9
моносомія X	13	8,4	12	9,2	8	6,0	33	7,9
47,XXY	1	0,7	–	–	1	0,8	2	0,4
трисомія X	1	0,7	–	–	1	0,8	2	0,4
трисомія 3	1	0,7	–	–	–	–	1	0,2
трисомія 13	–	–	1	0,7	–	–	1	0,2
трисомія 14	1	0,7	1	0,7	–	–	2	0,4
трисомія 15	3	2,1	3	2,3	2	1,5	8	1,9
моносомія 15	–	–	–	–	1	0,8	1	0,2
трисомія 16	9	5,8	12	9,2	7	5,3	28	6,7
трисомія 18	1	0,7	2	1,5	–	–	3	0,6
трисомія 20	2	1,4	–	–	–	–	2	0,4
трисомія 21	3	2,1	5	3,8	1	0,8	9	2,2
трисомія 22	3	2,1	4	3,1	–	–	7	1,7
триплоїдія	20	12,9	11	8,4	10	7,5	41	9,8
тетраплоїдія	–	–	–	–	3	2,3	3	0,7
моносомія X[40]/ трисомія X[60]	–	–	–	–	1	0,8	1	0,2
моносомія X[96]/ дисомія X[4]	1	0,7	–	–	–	–	1	0,2
моносомія 15[61]/ дисомія 15[39]	1	0,7	–	–	–	–	1	0,2
дисомія 21[38]/ трисомія 21[62]	1	0,7	–	–	–	–	1	0,2
моносомія 22[26]/ дисомія 22[23]/ трисомія 22[51]	–	–	–	–	1	0,8	1	0,2
2n[63]/4n[37]	1	0,7	–	–	–	–	1	0,2
2n[14]/3n[30]/4n[56]	–	–	1	0,7	–	–	1	0,2
Усього	155		131		133		419	

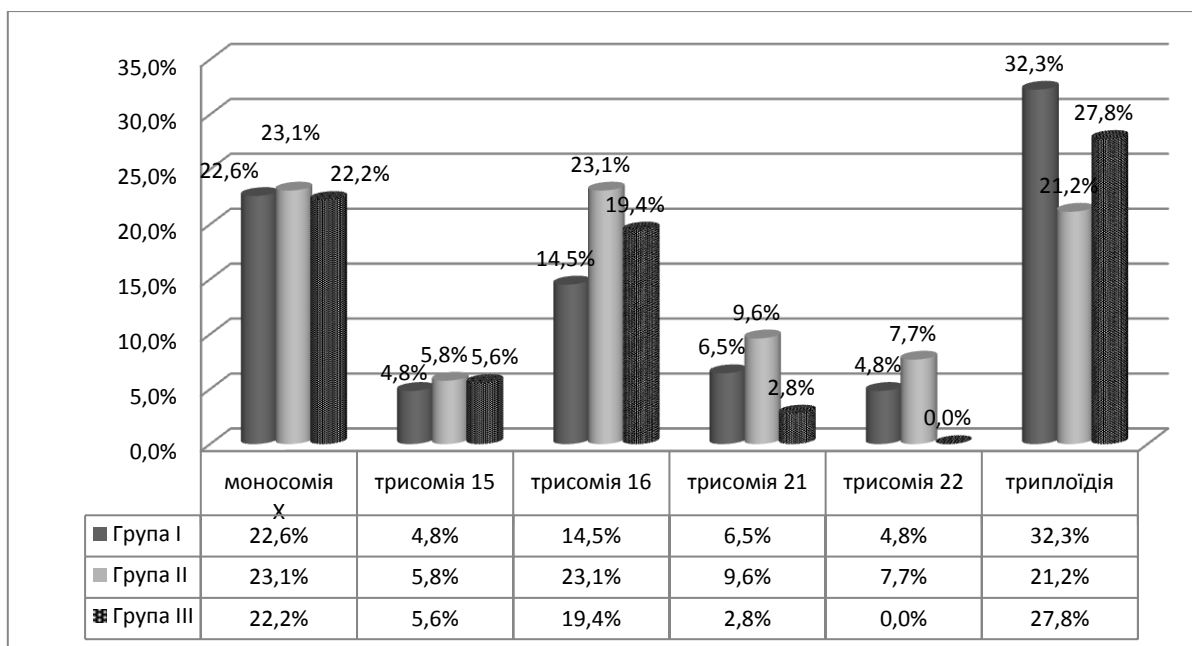


Рис. Частота ключових хромосомних аномалій мимовільно елімінованих ембріонів. Відсоток аномалій обчислений з урахуванням мозаїчних форм.

Отже, внесок хромосомної патології в генез мимовільного переривання вагітності є вищим при СРВ, ніж при ЗРВ. При ЗРВ домінуюча роль належить іншим чинникам, зокрема порушеній локальній імунній відповіді матері на плід [15].

### Висновки

1. Зміни каріотипу при ранніх репродуктивних втратах становлять 35,8 %.

2. Серед цитогенетичних аномалій спостерігали поліплоїдії – 30,7 % випадків, гоносомні анеуплоїдії – 24,7 %, аутосомні анеуплоїдії – 44,6 %.

3. Частота хромосомних аномалій при спорадичних втратах вагітності є вищою

(39,9 %) порівняно з регулярними втратами (27,1 %) в 1,47 раза.

4. Серед порушень каріотипу найчастіше спостерігали триплоїдії – 27,19 % при СРВ vs 27,78 % при ЗРВ, гоносомні моносомії – 21,93 % vs 22,22 % і трисомію за хромосоною 16 – 18,42 % vs 19,44 %.

5. Частота хромосомних порушень при СРВ відрізнялася в групі I та II, а саме: частота триплоїдій вища в групі I в 1,52 раза, а трисомія за хромосоною 16 – вища в групі II в 1,59 раза.

6. Лише при СРВ виявили трисомії за хромосомами 3, 13, 14, 18, 20 та 22, а в групі ЗРВ – тетраплоїдію та моносомію за хромосоною 15.

### Література

1. Карр Ф., Рициотти Х., Фройнд К., Кахан С. Акушерство, гинекология и здоровье женщины. – М.: «МЕДпресс-информ», 2005. – 60 с.
2. Ectopic pregnancy and miscarriage: diagnosis and initial management in early pregnancy of ectopic pregnancy and miscarriage // NICE Clinical Guidelines. – 2013. – V. 154.
3. Hassold T.J. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions // Am J Hum Genet – 1980. – V. 32, № 5. – P. 723–730.
4. Warburton D., Dallaire L., Thangavelu M., Ross L., Levin B., Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data // Am. J. Hum. Genet. – 2004. – V. 75. – P. 376–385.
5. Stirrat G.M. Recurrent miscarriage // Lancet. – 1990. – V. 336. – P. 673–675.
6. Branch D.W., Gibson M., Silver R.M. Clinical practice. Recurrent miscarriage // N. Engl. J. Med. – 2010. – V. 363, № 18. – P. 1740–1747. doi: 10.1056/NEJMc1005330.
7. Tang A.W., Quenby S. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 2010. – V. 22. – P. 446–451. doi: 10.1097/GCO.0b013e32833e124e.
8. Lee R.M., Silver R.M. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations // Semin. Reprod. Med. – 2000. – V. 18. – P. 433–440.
9. Stern J.J., Dorfman A.D., Gutierrez-Najar M.D. Frequency of abnormal karyotype among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion // Fertil. Steril. – 1996. – V. 65. – P. 250–253.
10. Ogasawara M., Aoki K., Okada S., Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation of previous miscarriage // Fertil. Steril. – 2000. – V. 73. – P. 300–304.
11. Simpson J.L. Genes, chromosomes and reproductive failure // Fertil. Steril. – 1980. – V. 33. – P. 107–116.
12. Carp H., Toder V., Aviram A., Daniely M., Mashiach S., Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage // Fertil. Steril. – 2001. – V. 75. – P. 678–682.
13. Баранов В.С. Метод стряхивания-отпечатывания – простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хориона // Цитология. – 1989. – Т. 31, № 2. – С. 251–253.
14. 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.
15. Tkach I.R., Sosnina K.O., Huleyuk N.L., Terpylyak O.I., Zastavna D.V., Weise A., Kosyakova N., Liehr T. Contribution of chromosomal abnormalities and genes of the major histocompatibility complex to early pregnancy losses // Biopolymers and Cell. – 2015. – V. 31, № 1. – P. 38–45. doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008CB.

**TKACH I.R.<sup>1</sup>, HULEYUK N.L.<sup>1</sup>, ZASTAVNA D.V.<sup>1</sup>, BEZKOROVAINA G.M.<sup>1</sup>, FEDYSHYN T.V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> State Institution «Institute of Hereditary Pathology NAMS of Ukraine»,  
Ukraine 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a, e-mail: tkach.iryana.ihp@gmail.com

<sup>2</sup> State University "Uzhhorod National University",  
Ukraine, 88000, Transcarpathian region, Uzhhorod, Narodna Square, 3

### THE CONTRIBUTION OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN THE FORMATION OF SPORADIC AND RECURRENT EARLY REPRODUCTIVE LOSSES

**Aim.** The aim of the present study was to investigate the contribution of numerical chromosomal imbalances in products of conception from sporadic pregnancy loss (SPL) and recurrent pregnancy loss (RPL). **Methods.** Banding cytogenetic and interphase mFISH with the probe panel for chromosomes 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y. **Results.** Cytoge-

netic studies of 419 spontaneously aborted fetuses were performed. The results were stratified in 3 groups according to anamnesis: Group I and II – SPL, Group III – RPL. The contribution of chromosomal aberrations was higher in the genesis of SPL (39.9 %) compared to RPL (27.1 %). Among most often diagnosed chromosomal change was triploidy – 27.19 % in SPL vs 27.78 % in RPL, monosomy X – 21.93 % vs 22.22 % and trisomy 16–18.42 % vs 19.44 %. **Conclusions.** Consequently, detection of chromosomal aneuploidies in samples from products of conception plays a key role to find out about reasons of reproductive failure in humans.

*Keywords:* sporadic pregnancy loss, recurrent pregnancy loss, banding cytogenetic, interphase multicolor fluorescence in situ hybridization (mFISH), chromosome abnormalities.