

Л.В. ТАВОКИНА, А.А. БРОВКО,
Я.А. СОПКО, Е.В. БАРОНОВА

Клиника «Исида-IVF», Киев
E-mail: L_Tavokina@isida.ua

РЕЗУЛЬТАТЫ КАРИОТИПИРОВАНИЯ МАТЕРИАЛА СПОНТАННЫХ АБОРТОВ И ЗАМЕРШИХ БЕРЕМЕННОСТЕЙ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ



Представлены результаты молекулярно-цитогенетического исследования материала спонтанных абортосов и замерших беременностей первого триместра у 43 супружеских пар, которым проводилось лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Общее число случаев с наличием хромосомных аномалий в кариотипе клеток ворсин хориона зародышей составило 28 (65 %). Проведен сравнительный анализ частоты и типов хромосомных аномалий в группах абортосов, разделенных в зависимости от патологических состояний спермы мужчин. На основании выводов разработаны рекомендации с целью повышения эффективности ВРТ.

© Л.В. ТАВОКИНА, А.А. БРОВКО, Я.А. СОПКО,
Е.В. БАРОНОВА, 2013

Введение. Известно, что особая роль в этиологии неразвивающейся беременности первого триместра принадлежит хромосомным aberrациям, которые обнаруживаются в кариотипах абортосов с частотой 50–60 %. Внедрение в репродуктивную медицину новых методов ВРТ привело к значительному прогрессу в лечении ранее неизлечимых форм бесплодия и невынашивания беременности. Однако в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) около 10 % наступивших беременностей также оказываются неразвивающимися и в итоге заканчиваются самоабортом [1]. В предыдущем исследовании [2] нами установлено, что частота аномальных кариотипов абортосов в группе женщин, у которых беременность наступила в цикле ЭКО, но замерла в первом триместре, была сопоставима с аналогичным показателем в группе сравнения, в которую вошли женщины с привычным невынашиванием беременности (52,3 и 61, 9% соответственно). Поэтому с целью профилактики хромосомной патологии у потомства представляется крайне важным выяснение роли генетических факторов, приводящих к невынашиванию беременности, которая наступила в цикле ЭКО.

Цель работы состояла в анализе результатов молекулярно-цитогенетического исследования клеток ворсин хориона материала спонтанных абортосов и беременностей, замерших в первом триместре, после лечения бесплодия методами ВРТ.

Материалы и методы. На протяжении 2000–2011 гг. у 43 супружеских пар проводилось исследование ворсин хориона зародышей, которые получены от беременностей, прерванных по причине остановки развития эмбриона или закончившихся самопроизвольным абортосом в сроке до 10 нед гестации. Все беременности получены в цикле ЭКО с применением различных методов ВРТ лечения бесплодия (внутриматочная инсеминация – 13 %, ЭКО – 17 %, ЭКО + ICSI – 53 %) с использованием собственных гамет. Принимая во внимание сходные этиологические причины и одинаковую тактику при диагностике самопроизвольных абортосов и неразвивающихся беременностей, мы объединили их в одну группу под названием «абортосы» [2]. Для решения поставленной задачи сравни-

ли представленные в настоящем сообщении данные с опубликованными нами ранее [2], которые получены для пациентов с самостоятельно наступившей беременностью. Последние составили группу сравнения.

В группе мужчин из супружеских пар возраст колебался от 24 до 65 лет (средний возраст – 39,8 года). Возраст женщин находился в диапазоне от 24 до 41 года (средний возраст – 31,7 года). Для постановки диагноза неразвивающейся беременности всем женщинам в сроке от 5 до 10 нед назначали ультразвуковое исследование. Мужчинам перед процедурой ЭКО проводили исследование спермы с последующим составлением спермограммы. У всех супругов определяли кариотип по лимфоцитам крови.

Для получения метафазных хромосом из клеток ворсин хориона абортоса использовали «прямой» метод, кариотип супругов определяли в лимфоцитах крови полумикрометодом [3]. Для анализа метафазных пластинок клеток ворсин хориона и лимфоцитов крови применяли методы GTG, CBG, QFQ дифференциальной окраски хромосом по длине и флюоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) [4] с использованием локус-специфических (LSI) к 13/21, 14/22, 15 и прицентромерных (CEP) к 16, 18, X, Y хромосомам ДНК проб, а также ДНК проб на целую хромосому (WCP) («Vysis», США). Для составления кариотипов использовали программу CytoVision (США).

Результаты исследования и их обсуждение. Общее количество случаев замерших беременностей и спонтанных абортос с подтверж-

денной по ворсинкам хориона хромосомной патологией в кариотипе абортоса было 28 (65 %), остальные 15 (35 %) имели нормальный кариотип.

Наиболее частыми показаниями для проведения ЭКО со стороны женщины в нашем исследовании были трубный фактор, Т-образная матка, снижение овариального резерва, эндометриоз, миома матки, а со стороны мужчины – нарушение сперматогенеза. При этом мужской фактор присутствовал в 74,8 % случаев, что и обусловило целесообразность выяснения в первую очередь взаимосвязи между хромосомной патологией у абортоса и нарушением сперматогенеза у мужчин.

Согласно рекомендациям ВОЗ [5] для нормозооспермии характерно наличие ≥ 15 млн и более сперматозоидов в 1 мл эякулята, из них ≥ 40 % подвижных, ≥ 32 % с прогрессивным движением, ≥ 50 % клеток с нормальной морфологией. Патологические состояния описываются терминами: олигозооспермия – концентрация сперматозоидов ниже нормативного значения, астенозооспермия – подвижность сперматозоидов ниже нормативного значения, тератозооспермия – морфология сперматозоидов ниже нормативного значения и азооспермия – отсутствие сперматозоидов в эякуляте. Возможно сочетание перечисленных форм при одновременном наличии соответствующих отклонений в эякуляте.

В нашей выборке, составленной согласно диагнозам (таблица), мужчины распределились следующим образом: группа 1 – норма-

Частота хромосомной патологии у абортосов при различных формах нарушения сперматогенеза у мужчин

№ группы	Патология	Количество	Показатели спермограммы			Частота хромосомной патологии, абс.ч. (%)
			Количество сперматозоидов $\times 10^6$ $M \pm m$	Неподвижные формы, %	Патологические формы, %	
1	Нормозооспермия	14	96,7 \pm 6,4	30	35	8 (57)
2	Астенозооспермия	25	28,3 \pm 4,9	54	56	16 (64)
3	Азооспермия	4 *	–	–	–	4 (100)
Всего		43				

* Пациентам производилась биопсия яичка.

зооспермия; группа 2 – астенозооспермия, включающая подгруппы мужчин с олигоастенозооспермией (5 случаев), тератозооспермией (3 случая), астенотератозооспермией (5 случаев), и группа 3 – азооспермия.

Частота хромосомных аномалий у абортусов в группе 1, где показатели спермы у мужчин соответствовали норме, составила 57 %. Группа 2 оказалась самой многочисленной, 25 (58 %) случаев от всех исследованных абортусов. В этой группе частота хромосомной патологии равнялась 64 %. Самой высокой (100 %) она была в группе 3 (4 случая), где показатели спермы соответствовали диагнозу азооспермия и при процедуре ЭКО/ICSI пришлось прибегнуть к биопсии яичка. При этом в трех случаях кариотип супругов был нормальным, в четвертом случае в кариотипе отца присутствовала инсерция (вставка) в короткое плечо хромосомы 1 фрагмента хромосомы 12 – 46,XY,ins(1;12)(p34.1;q23q22).

Анализ выявленных аномальных кариотипов показал, что наиболее частыми хромосомными аномалиями были анеуплоидии по различным аутосомам, которые составили 55 % (16 случаев), причем соотношение моносомий к трисомиям было в пользу последних – 1:15. Это подтверждает гипотезу о наличии сильного отбора против нуллисомных гамет. Анеуплоидии по половым хромосомам присутствовали во всех исследуемых группах, включая группу сравнения, приблизительно с сопоставимой частотой (нормозооспермия – 25 %, астенозооспермия – 21 %, азооспермия – 25 %, группа сравнения – 33 %). Напротив, полиплоидные кариотипы, обнаруженные в группе сравнения с частотой 24 %, практически отсутствовали в исследуемых в настоящей работе группах 1–3.

Обращает на себя внимание тот факт, что распределение различных типов хромосомных аномалий (рисунок) в представленных группах абортусов было неодинаковым.

Астенозооспермия – это форма нарушения сперматогенеза, при которой происходит снижение количества подвижных форм, а также скорости движения сперматозоидов в эякуляте. Выделяют несколько возможных причин этого состояния: изменение химическо-

го состава плазмы спермы, уменьшение/исчезновение отрицательного электрического заряда спермиев как результат оседания на их поверхности различных микроорганизмов, длительное половое воздержание, частичная непроходимость канала, варикоцеле и др. Но в последнее время все более пристальное внимание отводится роли генетических факторов: мутации в структурных генах ядерной или митохондриальной ДНК, приводящие не только к уменьшению подвижных сперматозоидов, но и к появлению патологических форм [6, 7]. Анализ показал, что хромосомная патология в этой группе, характеризовалась разнообразием трисомий (рисунок). Интересно, что в отличие от всех остальных групп, наиболее частой была трисомия хромосомы 22 (3 случая, 19 %), которая является сублетальной. Трисомии по хромосомам 2, 21, 18, 17, 9, 14, 16, 20, которые большей частью также являются летальными или сублетальными [9, 10], были представлены по 1 (6 %) случаю. Наши результаты подтверждают данные литературы о том, что полная трисомия хромосомы 20 считается летальной и выявляется только пренатально [8]. Как правило, трисомия по хромосоме 20 ограничивается экстраэмбриональными тканями либо представлена в отдельных тканях плодов (почки, прямая кишка и др.).

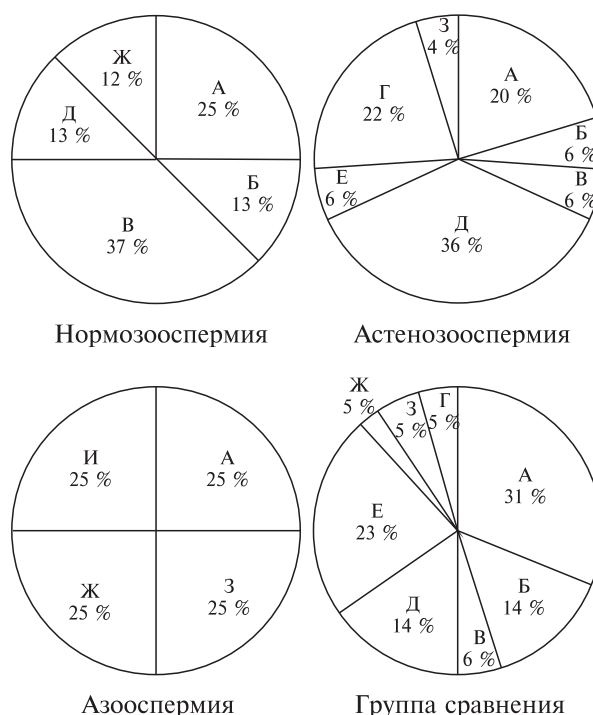
Необходимо отметить, что в группе мужчин с различными формами астенозооспермии частота трисомии хромосомы 16 в кариотипе абортуса составила только 6 % (1 случай), хотя доказано, что ее полная форма – очень частая патология в материале спонтанных абортусов при естественной беременности [3]. Последнее согласуется с нашими наблюдениями [2]. Как правило, при такой трисомии выживают только мозаичные формы, уровень мозаицизма определяет исход беременности [11,12]. Существенными были отличия в частоте встречаемости у абортусов трисомии по хромосоме 21 между группой мужчин с нормозооспермией (21 %), с одной стороны, и группами мужчин с астенозооспермией (6 %), а также группой сравнения (6 %) – с другой. Возможно, различия объясняются тем, что группа 1 представлена мужчинами с нормальными по-

казателями спермы и женщинами с бесплодием преимущественно трубно-перитонеального генеза.

Отдельно следует рассмотреть случай сочетания мужского и женского факторов бесплодия: олигоастенозооспермия у мужа и присутствие сбалансированной структурной хромосомной перестройки в кариотипе жены – 45,XX,der(13;14)(q10;q10). Эта супружеская пара ранее имела три попытки ЭКО/ICSI. Настоящая беременность наступила после процедуры ICSI, однако она замерла в первом триместре. УЗИ определило у зародыша 5–6 нед гестации анэмбрионию. Кариотип по ворсинам хориона был несбалансирован – 46,XY,+13,der(13;14)(q10;q10), mat, что, вероятнее всего, стало причиной замирания беременности. По данным литературы [13], у носителей сбалансированных структурных перестроек может быть также повышена частота анеуплоидий в гаметах как результат межхромосомного взаимодействия в ходе мейоза. Заслуживает внимания еще один случай остановки развития эмбриона с мозаичным кариотипом по хромосоме Y (mos47,XYqh-[53]/46,XYqh-[47]). При этом в кариотипе отца с олигоастенозооспермией отмечено уменьшение гетерохроматина длинного плеча хромосомы Y (q12) (вариант нормы согласно номенклатуре ISCN). В литературе обсуждается вопрос о влиянии полиморфизма гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9, 16, Y на infertility индивидумов [14].

Кроме этого, нами установлено, что в подгруппах мужчин с олигоастенозооспермией и олигоастенотератозооспермией определена самая высокая частота кариотипов с дисомиями по половым хромосомам – 3 случая (21 % от общего числа хромосомных патологий в группе 2), что согласуется с литературными данными [15]. Другие авторы [16] обращают внимание на роль фрагментации ДНК сперматозоидов, предполагая существование корреляции между качеством спермы, качеством эмбриона и исходом беременности [17, 18].

Можно допустить, что разнообразие этиологических факторов, приводящих к возникновению астенозооспермии, могли обусловить не типичный для других групп (рисунок)



Спектры типов хромосомных aberrаций в различных группах абортосов: А – половые хромосомы; Б – трисомия 16; В – трисомия 21; Г – трисомия 22; Д – другие анеуплоидии; Е – полиплоидия; Ж – маркерные хромосомы; З – структурные перестройки хромосом; И – 9ph

спектр хромосомных аномалий в этой группе абортосов. Однако этот вопрос требует более детального исследования.

При диагнозе азооспермия сперматозоиды в эякуляте пациента, как правило, отсутствуют. В одном случае азооспермия у мужа сочеталась со сбалансированной структурной перестройкой 46,XY,ins(1;12)(p34.1;q23q22), кариотип эмбриона был аномальный с присутствием дериватной хромосомы отцовского происхождения – 46,XY,der(12)pat. В трех остальных случаях установлены кариотипы абортосов 47,XY, 47,XY,+mar, 46,XX,9ph. Вероятно, оплодотворение незрелыми сперматозоидами, полученными при биопсии яичка, не смогли в полной мере обеспечить процессы развития эмбриона на ранних этапах. Таким парам рекомендовано в последующих циклах ЭКО использовать донорскую сперму.

Определение кариотипа у супружеских пар показало, что у 35 (95,3 %) из них он был

нормальным и только в 2 случаях (4,7 %) – аномальный со структурной перестройкой у одного из супругов. У 6 (14 %) пар в кариотипе мужа присутствовали полиморфные варианты хромосом, которые не выходили за пределы нормальной вариабельности (ISCN 2009 г.), причем в пяти случаях это был полиморфизм гетерохроматина Y(q12) и в двух – перичентрическая инверсия 9p11 (группа мужчин с азооспермией).

Выводы. Таким образом спонтанная остановка развития зародыша в первом триместре беременности в 65 % случаев обусловлена нарушением в хромосомном аппарате клетки. Анализ полученных данных показал, что на раннем этапе развития частота хромосомных аномалий в клетках замерших эмбрионов после экстракорпорального оплодотворения и в естественной беременности существенно не отличаются. Группа абортусов при наличии диагностированной астенозооспермии у мужа оказалась самой многочисленной (25 случаев, 58 %). И именно эта группа существенно отличалась от других групп спектром выявленных у зародыша хромосомных аномалий в основном за счет многообразия аутосомных анеуплоидий. Поэтому, чтобы исключить генетическую доминанту, пациентам с репродуктивными проблемами, кроме морфологических исследований, показан комплекс генетических тестов, таких как кариотипирование супругов, исследование уровня анеуплоидий и фрагментации ДНК в сперме, а также диагностика мутаций ядерной и митохондриальной ДНК сперматозоидов. Если попытки экстракорпорального оплодотворения с неблагоприятным исходом беременности зародышем с хромосомной патологией повторяются, супругам может быть рекомендована предимплантационная генетическая диагностика или использование донорской спермы.

L.V. Tavokina, A.A. Brovko, Ya.A. Sopko, E.V. Baronova

RESULTS KARYOTYPING MATERIAL OF SPONTANEOUS ABORTIONS AND MISCARRIAGES AFTER USING ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

The results of molecular cytogenetic study of spontaneous abortions and material non progressive pregnancies in the first trimester in 43 couples who were

treated with various methods of ART are presented in this report. Chromosomal pathology (CP) was present in 28 (65 %) samples of chorionic villi. A comparative analysis of the frequency and types of CPs in groups, composed according to the pathological states in the semen of men was done. The recommendations to improve the efficiency of ART were developed based on the data.

L.V. Tavokina, A.O. Brovko, Ya.O. Sopko, O.V. Baronova

РЕЗУЛЬТАТИ КАРІОТИПУВАННЯ МАТЕРІАЛУ СПОНТАННИХ АБОРТІВ ТА ЗАВМЕРЛИХ ВАГІТНОСТЕЙ ПІСЛЯ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Наведено результати молекулярно-цитогенетичного дослідження матеріалу спонтанних абортів та завмерлих вагітностей першого триместру в 43 подружніх пар, у яких для лікування непліддя були використані різні методи допоміжних репродуктивних технологій. Загальна кількість випадків з виявленою хромосомною патологією (ХП) в кариотипі клітин ворсин хоріону зародка становило 28 (65 %). Проведено порівняльний аналіз частоти і типів ХП в групах абортусів, які були складені згідно з патологічними станами сперми чоловіків. На підставі висновків розроблено рекомендації з метою підвищення ефективності допоміжних репродуктивних технологій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Tummers P., De Sutter P., Dhont M.* Risk of spontaneous abortion in singleton and twin pregnancies after IVF/ICSI // *Human Reprod.* – 2003. – **18**, № 8. – P. 1720–1723.
2. *Тавокина Л.В., Сопко Н.И., Хажиленко К.Г., Баронова Е.В.* Молекулярно-цитогенетическое исследование абортусов у женщин с нарушением репродуктивной функции // *Цитология и генетика.* – 2006. – **40**, № 2. – С. 72–78.
3. *Баранов В.С., Кузнецова Т.В.* Цитогенетика эмбрионального развития человека. – СПб, 2007. – 639 с.
4. *Anton E., Blanco J., Egozcue J., Vidal F.* Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10) // *Hum. Reprod.* – 2004. – **19**. – P. 1345–1351.
5. *WHO* laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. – Cambridge : Univ. press., 2010. – 139 p.
6. *Durakbasi-Dursun H.G., Zamani A.G., Kutlu R., Gorkemli H., Bahce M., Acar A.* A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoatozoospermia: detec-

- tion of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set // *Fertil. Steril.* – 2008. – **89**. – P. 1709–1717.
7. Faure A.K., Aknin-Seifer I., Frérot G., Pelletier R., De Robertis C., Cans C., Levy R., Jimenez C., Lejeune H., Terrier N., Bergues U., Hennebicq S., Rousseaux S. Predictive factors for an increased risk of sperm aneuploidies in oligoasthenoteratozoospermic males // *Int. J. Androl.* – 2007. – **30**. – P. 153–162.
 8. Robinson W.P., McGillivray B., Lewis M.E., Arbour L., Barrett I., Kalousek D.K., Robinson W.P. Prenatally detected trisomy 20 mosaicism // *Prenat. Diagn.* – 2005. – **25**, № 3. – P. 239–244.
 9. Bruns D. Presenting physical characteristics, medical conditions, and developmental status of long-term survivors with trisomy 9 mosaicism // *Amer. J. Med. Genet.* – 2011. – **155**, № 5. – P. 1033–1039.
 10. Robinson J., Stewart H., Moore L., Gaunt L. A case of mosaic trisomy 2 diagnosed at amniocentesis in an abnormal fetus and confirmed in multiple fetal tissues // *Clin. Genet.* – 1997. – **51**, № 6. – P. 417–420.
 11. Тавокина Л.В., Сопко Н.И., Буйнова В.А., Сопко Я.А., Баронова Е.В. Сложный для диагностики случай мозаицизма трисомии 16 хромосомы, выявленный пренатально // *Цитология и генетика.* – 2006. – **40**, № 3. – С. 59–66.
 12. Langlois S., Yong P.J., Yong S.L., Barrett I., Kalousek D.K., Miny P., Exeler R., Morris K., Robinson W.P. Postnatal follow-up of prenatally diagnosed trisomy 16 mosaicism // *Prenat. Diagn.* – 2006. – **26**, № 6. – P. 548–558.
 13. Douet-Guilbert N., Bris M.J., Amice V., Marchetti C., Delobel B., Amice J., De Braekeleer M.D., Morel F. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature // *Int. J. Androl.* – 2005. – **28**, № 6. – P. 372–379.
 14. Minocherhomji S., Athalye A.S., Madon P.F. et al. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype // *Fertil. and Steril.* – 2009. – **92**, № 1. – P. 88–95.
 15. Avendaco C., Franchi A., Duran H., Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome // *Fertil. and Steril.* – 2010. – **94**, № 2. – P. 549–557.
 16. Huang C.C., Lin D.P., Tsao H.M., Cheng T.C., Liu C.H., Lee M.S. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates // *Fertil. and Steril.* – 2005. – **84**, № 1. – P. 130–140.
 17. Li Z., Wang L., Cai J., Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and metaanalysis // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2006. – **23**, № 9/10. – P. 367–376.
 18. Zini A., Meriano J., Kader K., Jarvi K., Laskin C.A., Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI // *Hum. Reprod.* – 2005. – **20**, № 12. – P. 3476–3480.

Поступила 10.06.11