

УДК 618.177-089.888.11

А.В. СТЕФАНОВИЧ¹, Е.В. ЧЕРВЯКОВА¹,
Е.В. ШЕМЕТУН¹, В.Л. БУТЕНКО², О.А. ТАЛАН¹,
И.Р. БАРИЛЯК¹

¹Научный центр медицинской генетики АМН Украины, Киев

²Институт генетики репродукции, Киев

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ООЦИТОВ У ЖЕНЩИН С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ



Представлены результаты цитогенетического исследования частоты и типов хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови 31 женщины, страдающей бесплодием. Показана высокая частота (16,4 %) нарушений кариотипа в обследованной группе. Сравнивали морфофункциональные характеристики ооцитов, полученных у женщин с нормальным и аномальным кариотипом. Ооциты пациенток с хромосомными аномалиями обладали сниженной способностью к оплодотворению и дальнейшему развитию.

© А.В. СТЕФАНОВИЧ, Е.В. ЧЕРВЯКОВА, Е.В. ШЕМЕТУН,
В.Л. БУТЕНКО, О.А. ТАЛАН, И.Р. БАРИЛЯК, 2003

Введение. В настоящее время широко обсуждается и активно исследуется вопрос о хромосомных аномалиях и их влиянии на репродуктивную функцию человека [1–4], другими словами, проблема взаимосвязи хромосомных нарушений в соматических и половых клетках.

Отсутствие хромосомных аномалий в соматических клетках не исключает их наличие в гаметах. Хромосомные нарушения в половых клетках возникают в ходе гаметогенеза вследствие нарушения расхождения хромосом в мейозе под влиянием различных, часто не выясненных причин. Оогенез в отличие от сперматогенеза особенно чувствителен к воздействию как внешних, так и внутренних факторов [5]. Об этом свидетельствует достаточно высокий уровень хромосомных аномалий в ооцитах человека, в частности в неоплодотворившихся *in vitro* ооцитах, который, по данным разных авторов, достигает 50 %, а в среднем составляет 26,5 % [5–7]. Это значительно выше, чем, например, в сперматозоидах человека (6–8 %) [8]. Хромосомные аномалии ооцитов, часто не препятствуя оплодотворению, дают начало аномально развивающимся эмбрионам, которые, в свою очередь, становятся основной причиной ранних эмбриональных потерь и снижения уровня плодовитости человека [5].

Вместе с тем естественно предположить, что хромосомный дисбаланс, определяемый в соматических клетках (трисомии, моносомии), конститутивные хромосомные аномалии (сбалансированные транслокации, инверсии) и высокий уровень генетической нестабильности могут наряду с другими факторами влиять на гаметогенез и тем самым играть существенную роль в этиологии бесплодия. В то же время пока еще нет однозначного представления о причастности того или иного варианта аномалий кариотипа к нарушению репродуктивной функции [1–4].

Наиболее частые генетические причины мужского бесплодия — числовые и структурные хромосомные aberrации, а также микроделеции длинного плеча Y-хромосомы [9, 10]. В отличие от мужского бесплодия генетическая природа женского до сих пор мало изучена. Возможно, это связано с тем, что у женщин отсутствует «маркерная» хромосома, контролирующая репродуктивные процессы. Кроме того, если нарушение репродуктивной функции у мужчин так или иначе связано с наруше-

ниями сперматогенеза, причины женского бесплодия более разнообразны: анатомические аномалии, воспалительные заболевания половых органов, непроходимость маточных труб, эндокринные нарушения; эндометриоз. К нарушению репродуктивной функции у женщин приводят также числовые и структурные аномалии хромосом [11, 12].

Современные вспомогательные репродуктивные технологии, в частности экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и его разновидность ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), позволяют преодолеть почти все формы мужского и женского бесплодия, но в то же время эффективность ЭКО не превышает 30–45 %. Наблюдается категория пациентов с повторными неудачными попытками лечения бесплодия этими методами. Одной из причин неудачных попыток ЭКО может быть морфофункциональная неполноценность ооцитов, их сниженная способность к оплодотворению и дальнейшему развитию, а также хромосомные нарушения в них [13], которые, в свою очередь, могут быть обусловлены аномалиями кариотипа соматических клеток.

При цитогенетическом обследовании пациентов с бесплодием показана повышенная частота (3,7–13,1 %) хромосомных aberrаций, в структуре которых преобладают числовые нарушения половых хромосом. Реже встречаются структурные хромосомные аномалии (реципрокные транслокации, инверсии). При этом отмечается равный риск конститутивных aberrаций у мужчин и женщин [4].

В целом у женщин с нарушением репродуктивной функции описаны следующие сбалансированные структурные аномалии аутосом: реципрокные транслокации $t(5; 16)(q12; q12)$, $t(3; 5)(q13; q32)$, $t(11; 18)(p15; q21)$, $t(10; 22)(q24; q12)$, $t(1; 4)(q32; q2)$, $t(1; 22)(q21; q11)$, $t(1; 6)(q41; q24)$; робертсоновские транслокации $der(14; 21)(q10; q10)$, $der(13; 14)(q10; q10)$, $der(13; 15)(q10; q10)$, $der(21; 22)(q10; q10)$; перцентрические инверсии 8, 9, 10 хромосом и многие другие [1–4, 14–18]. Влияние отдельных aberrаций на репродуктивную функцию изучено недостаточно.

Результаты цитогенетического исследования супружеских пар, страдающих бесплодием, дают основание предполагать, что некоторые

хромосомные аномалии могут быть маркерами нарушений репродуктивной функции.

Целью настоящей работы было определение частоты и типов хромосомных нарушений в лимфоцитах у женщин, страдающих бесплодием, а также сравнение количественных, морфофункциональных характеристик ооцитов, полученных у женщин с нормальным и аномальным кариотипом в ходе лечения методом ЭКО.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила периферическая кровь пациенток, находившихся на обследовании и лечении в Институте генетики репродукции, а также ооциты, полученные у части тех же женщин, проходивших впоследствии лечение методом ЭКО.

Исследуемая группа состояла из 31 женщины в возрасте от 22 до 39 лет, у которых согласно данным клинического и лабораторного исследований были диагностированы различные формы первичного или вторичного бесплодия, а также невынашивание беременности. Длительность бесплодия в среднем составила 4,9 лет (от 1,0 до 12 лет).

Хромосомные препараты из фитогемагглютинин-стимулированных лимфоцитов периферической крови готовили по общепринятой методике. Идентификацию каждой пары хромосом и их нарушений проводили после дифференциального окрашивания препаратов (G-метод) при увеличении $\times 1000$, согласно критериям ISCN (1995). При обнаружении aberrации анализировали дополнительно по 10 клеток на каждую aberrацию. Клоновыми считали одинаковые аномалии, найденные в двух различных клетках.

Ооциты получали в ходе программ ЭКО путем трансвагинальной пункции и аспирации преовуляторных фолликулов после гормональной стимуляции суперовуляции. Были использованы данные эмбриологических протоколов каждой пациентки, в которых учитывались количество попыток ЭКО, количество полученных ооцитов, их морфологическая оценка, результаты оплодотворения и дробления зигот *in vitro*, количество использованных для переноса эмбрионов. Достоверность различий этих показателей для двух групп женщин (с нормальным и аномальным кариотипом) оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты цитогенетического обследования женщин, страдающих бесплодием, представлены в табл. 1. При анализе G-окрашенных метафазных хромосом у 22 из 31 (70,8 %) женщины был установлен нормальный 46,XX кариотип, в одном случае (3,2 %) обнаружен хромосомный вариант, в трех случаях (9,6 %) — единичные aberrации. У 5 (16,4 %) пациенток были найдены аномалии кариотипа. Установленная частота нарушений кариотипа (16,4 %) выше данных литературы (3,7–13,1 %) [15–17], что может быть связано с небольшой выборкой обследованных женщин.

Как видно из табл. 1, числовых или структурных аномалий половых хромосом у пациенток этой группы обнаружено не было. У 5 женщин были найдены структурные аномалии аутосом: реципрокные транслокации t(3; 6)(q27; p21.2), t(4; 9)(p11; p11) и t(12; 22)(p11.2; p11.2), дериват хромосомы 9, интерстициальные делеции del(20)(p11.1–p11.2) и del(1)(q11.1–q11.2), а также робертсоновская транслокация der(13; 22)(q10;q10). В одном случае был только хромосомный вариант — увеличенные спутники у хромосомы 13 — 46,XX, 13sgh+.

У женщины 22 лет с первичным трубно-перитонеальным бесплодием в течение трех лет была обнаружена реципрокная транслокация t(3; 6)(q27; p21.2) в 5 из 20 проанализированных метафаз. В литературе есть описание транслокации t(3; 6) с вовлечением короткого плеча хромосомы 3 у пациентки с невынашиванием беременности — t(3; 6)(p14.1; p21.2) [18].

У пациентки 24 лет со смешанным трубно-перитонеальным и эндокринным бесплодием в течение 1,5 лет был установлен кариотип 46,XX, del(20)(p11.1–p11.2). Интерстициальная делеция del(20)(p11.1–p11.2) наблюдалась в 4 из 13 клеток.

У больной 36 лет со вторичным трубно-перитонеальным бесплодием в течение трех лет была выявлена высокая частота хромосомных нарушений — 9 из 30 проанализированных метафаз были aberrантными. Среди значительного количества единичных транслокаций, делеций, дериватов и дупликаций клоновыми были реципрокная транслокация t(4; 9)(p11; p11) и дериват хромосомы 9 — der 9q, которые на-

Таблица 1
Хромосомные аномалии клеток крови у пациенток с бесплодием

Возраст женщины	Продолжительность бесплодия, годы	Кариотип лимфоцитов периферической крови	Количество	
			проанализированных клеток	aberrантных метафаз
22	3	46, XX, t (3; 6) (q 27; p 21.2)	20	5
24	1,5	46, XX, del (20) (p 11.1–p 11.2)	23	4
36	3	46, XX, t (4; 9) (p 11; p 11), der9q	30	9
29	5	46, XX, del (1) (q 11.1–q 11.2) der (13; 22) (q10; q10)	30	30
38	1	46, XX, t (12; 22) (p 11.2; p 11.2)	13	13
30	11	46, XX, 13sgh+	13	13

*Хромосомный вариант.

людались в 4 клетках. В транслокации t(4; 9)(p11; p11) участвует локус 9p11, который вовлечен в часто наблюдаемую при бесплодии перцентрическую инверсию inv(9)(p11; q12) [12]. Дериваты хромосомы 9 описаны у мужчин и женщин с нарушением репродуктивной функции [17,18]. Кроме того, у пациенток с высоким уровнем aberrаций в лимфоцитах периферической крови реже бывают благополучные исходы ЭКО, чаще наблюдается анеуплоидия плодов [16].

Эти три случая (женщины 22, 24 и 36 лет, табл. 1) являются примерами мозаицизма аутосом. Данные о взаимосвязи мозаицизма и бесплодия, мозаицизма и ранних эмбриональных потерь противоречивы [1]. Уровень мозаицизма в общей популяции до сих пор не установлен. Некоторые считают его роль в этиологии бесплодия недооцененной [19]. Так, удалось обнаружить корреляцию между мозаицизмом и низким уровнем имплантации [20].

У пациентки 29 лет со смешанным трубно-перитонеальным и эндокринным бесплодием в течение пяти лет во всех 30 проанализированных метафазах были обнаружены робертсоновская транслокация с участием 13 и 22 хромосомы — der(13; 22)(q10; q10) и интерстициальная делеция хромосомы 1 — del(1)(q11.1–q11.2).

Таблица 2

Количественные и морфофункциональные характеристики ооцитов у женщин с нормальным и аномальным кариотипом

Количество женщин	Средний возраст	Средняя продолжительность бесплодия	Количество полученных ооцитов	Качество ооцитов, абс./%			Оплодотворение, абс. / %	Дробление, абс. / %	Количество перенесенных эмбрионов	Проц. эмбрионов от полученных ооцитов
				хорошее	удовлетворительное	неудовлетворительное				
С нормальным кариотипом										
13	28,9	4,6	144	$\frac{76}{52,8 \pm 1,1}$	$\frac{37}{25,7 \pm 3,6}$	$\frac{31}{21,5 \pm 3,4}$	$\frac{90}{62,5 \pm 1,3}$	$\frac{83}{57,6 \pm 1,2}$	83	57,7 $\pm$ 4,9
С хромосомными аномалиями										
6	29,7	4,1	99	$\frac{65}{65,7 \pm 1,4^*}$	$\frac{12}{12,1 \pm 3,3^{**}}$	$\frac{12}{12,1 \pm 3,3^{**}}$	$\frac{58}{58,6 \pm 1,2^{**}}$	$\frac{42}{42,4 \pm 0,9^{***}}$	26	26,3 $\pm$ 4,4***

* p < 0,01; **p < 0,05; ***p < 0,001.

Робертсоновские транслокации часто описывают при мужском и женском бесплодии [2, 4, 14, 16, 17], невынашивании беременности. Наличие этой аберрации увеличивает риск возникновения анеуплоидии у плода [2, 16, 17].

У женщины 30 лет с трубно-перитонеальным и эндокринным бесплодием в течение 11 лет обнаружены увеличенные за счет гетерохроматина спутники хромосомы 13 (13sgb+), что является хромосомным вариантом. У 22 % супружеских пар, страдающих бесплодием или имеющих в анамнезе спонтанные аборт, выявляются хромосомные варианты, связанные с увеличением гетерохроматиновых районов хромосом или инверсией околоцентромерного гетерохроматина. Наиболее часто описываются варианты 1qh+, 9qh+, 16qh+, Yqh+. Роль полиморфных вариантов хромосом недостаточно изучена, нет однозначного представления о вкладе того или иного варианта в нарушение репродуктивной функции человека [15].

У пациентки 30 лет со вторичным трубно-перитонеальным бесплодием обнаружена реципрокная транслокация t(12;22)(p11.2; p11.2). Считают, что среди хромосомных нарушений именно сбалансированные транслокации связаны с различными формами репродуктивных потерь — начиная с нарушений в гаметогенезе и заканчивая спонтанными абортами. Было также показано, что у женщин с повторными неудачными попытками ЭКО особенно велика вероятность сбалансированных транслока-

ций [2]. В связи с этим интересно отметить, что в исследуемой нами группе у пациентки 22 лет с реципрокной транслокацией t(3; 6)(q27; p21.2) (табл. 1) были три безуспешные попытки ЭКО. Возможно, следствием сбалансированных транслокаций, наблюдаемых в кариотипе соматических клеток, являются несбалансированные транслокации у части гамет, что и может приводить к доимплантационным эмбриональным потерям и повторным неудачам при лечении методом ЭКО [2].

Таким образом, в обследованной группе женщин, страдающих бесплодием, выявлена высокая частота (16,4 %) нарушений кариотипа. Аномалий половых хромосом в обследованной группе не обнаружено. Типы аберраций аутосом (реципрокные транслокации, робертсоновские транслокации, делеции, дериваты хромосом) соответствуют данным литературы.

Большинство женщин исследуемой группы проходили лечение методом ЭКО. Мы сравнили морфофункциональные характеристики ооцитов, полученных в ходе ЭКО у пациенток с нормальным (13 женщин) и аномальным кариотипом (6 женщин). Как видно из табл. 2, средний возраст и продолжительность бесплодия у пациенток этих двух групп были близкими. У женщин с нормальным кариотипом (1-я группа) процент ооцитов хорошего качества (т.е. с высокой морфологической оценкой ооцита и окружающих его клеток кумулюса) достоверно ниже, чем в группе женщин с аномальным кариотипом (2-я группа) (52,8 ± 1,1 % против

65,7 ± 1,4 %; $p < 0,01$). И, наоборот, количество ооцитов низкого качества достоверно выше в 1-й группе по сравнению со 2-й (21,5 ± 3,4 % против 12,1 ± 3,3 %; $p < 0,05$). Уровень оплодотворения ооцитов несколько выше в группе с нормальным кариотипом (62,5 ± 1,3 % против 58,6 ± 1,2 %; $p < 0,05$), при этом уровень дробящихся зигот значительно выше в этой же группе по сравнению со 2-й (57,6 ± 1,2 % против 42,4 ± 0,9 %; $p < 0,001$). Разница еще более существенна, если сравнить процент полученных для переноса эмбрионов от изначального количества ооцитов, полученных в этих группах женщин (57,7 ± 4,9 % против 26,3 ± 4,4 %; $p < 0,001$).

На основании полученных данных можно предположить, что хромосомные аномалии, обнаруженные в соматических клетках женщин, в ходе мейоза могут оказывать отрицательное воздействие на морфофункциональное состояние ооцитов. Это может выражаться в хромосомных аномалиях ооцитов и в дисморфиях, т.е. в тонких морфологических нарушениях на уровне органелл, которые, в свою очередь, связаны с хромосомными аномалиями ооцитов [13, 21].

Это также подтверждает предположение о существовании естественного биологического отбора при оплодотворении *in vitro*, направленного против ооцитов со структурными аномалиями ядра и цитоплазмы [5, 13], причем отбор функционально полноценных ооцитов осуществляется, по-видимому, не в процессе созревания, а в ходе оплодотворения и, в особенности, дальнейшего развития зигот.

Выводы. Ооциты, полученные у женщин с нарушениями кариотипа, несмотря на нормальные морфологические характеристики, обладают сниженной способностью к оплодотворению и, особенно, к дальнейшему развитию и образованию полноценных эмбрионов по сравнению с ооцитами женщин с нормальным кариотипом.

Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности цитогенетического обследования супружеских пар перед применением вспомогательных репродуктивных технологий, в особенности у пациентов с повторным безрезультатным их применением, а также женщин — доноров яйцеклеток. Это может из-

менить тактику лечения и повысить его эффективность, а также способствовать обнаружению генетических маркеров нарушения репродуктивной функции.

SUMMARY. Results of cytogenetic investigation of the rate and the types of chromosome aberrations in lymphocytes of peripheral blood in 31 infertile women are presented. The high frequency of karyotype abnormalities (16,4 %) has been shown in the studied group. Morphofunctional characteristics of the oocytes of the women with normal and abnormal karyotypes have been compared. Oocytes of the patients with chromosome abnormalities were characterized by reduced ability to fertilization and further development.

РЕЗЮМЕ. Вивчали типи та частоту хромосомних аномалій в клітинах периферичної крові жінок, що страждають на непліддя. Показано високу частоту хромосомних аберацій в цій групі пацієнток. Порівнювали морфофункціональні характеристики ооцитів жінок з нормальним та аномальним кариотипом. Ооцити жінок з хромосомними аномаліями мали знижену здатність до запліднення та подальшого розвитку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raziel A., Friedler S., Schachter M., Kasterstein E., Strassburger D., Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after *in vitro* fertilization // *Fertil. and Steril.* — 2002. — **78**, № 3. — P. 515–519.
2. Stern C., Pertile M., Norris H., Hale L., Baker H.W.G. Chromosome translocations in couples with *in vitro* fertilization implantation failure // *Hum. Reprod.* — 1999. — **14**, № 8. — P. 2097–2101.
3. Peschka B., Leygraaf J., van der Ven K., Montag M. et al. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection // *Hum. Reprod.* — 1999. — **14**, № 9. — P. 2257–2263.
4. Gekas J., Thepot F., Turleau C., Siffroi J. et al. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men // *Hum. Reprod.* — 2001. — **16**, № 1. — P. 82–90.
5. Plachot M. Chromosomal abnormalities in oocytes // *Mol. and Cell. Endocrinol.* — 2001. — **183**. — P. S59–S63.
6. Angell R.R., Templeton A.A., Aitken R.J. Chromosome studies in human *in vitro* fertilization // *Hum. Genet.* — 1986. — **72**, № 2. — P. 333–339.
7. Стефанович А.В., Барилляк И.Р., Дахно Ф.В. и др. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека // *Цитология и генетика* — 1995. — **29**, № 5. — С. 54–60.
8. Martin R.H., Balkan W., Burns K. et al. The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa // *Hum. Genet.* — 1983. — **63**. — P. 305–309.

9. Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф. Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин (обзор литературы) // Пробл. репродукции. — 1998. — 2. — С. 12–19.
10. Van Asshe E., Bonduelle M., Tournai H. et al. Cytogenetics of infertile men // Hum. Reprod. — 1996. — 11. Suppl. 40. — P. 1–24.
11. Templeton A.A. Epidemiology of infertility // Infertility. — London, 1992. — P. 23–35.
12. Барцева О.В., Пулина Г.А., Балашова Е.В. и др. Цитогенетическое обследование супружеских пар в программе ЭКО // Пробл. репродукции. — 1998. — № 4. — С. 37–38.
13. Van Blerkom J., Henry G. Oocyte dysmorphysm and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation // Hum. Reprod. — 1992. — 7, № 2. — P. 379–390.
14. Schreurs A., Leguis E., Meuleman C., Stern C. et al. Increased frequency of chromosomal abnormalities in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or ICSI // Fertil. and Steril. — 2000. — 74, № 1. — P. 94–96.
15. Ворсанова С.Г., Берешева А.К., Казанцева Л.З. и др. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции // Пробл. репродукции. — 1998. — № 4. — С. 41–46.
16. Van der Ven K., Peschka B., Montag M. et al. Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing ICSI // Hum. Reprod. — 1998. — 13, № 1. — P. 48–54.
17. Montag M., van der Ven K., Ved S., Schmutzler A. et al. Success of intracytoplasmic sperm injection in couples with male and/or female chromosome aberrations // Hum. Reprod. — 1997. — 12, № 12. — P. 2635–2640.
18. Scarina R., Anichini C., Vivarelli R. et al. Correlation of the clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. — 1992. — 68, № 3. — P. 175–181.
19. Simpson J.L. Disorders of sex chromosomes and sexual differentiation // Genetics in obstetrics and gynecology / Eds J.L. Simpson, M.S. Golbus. — Philadelphia : WB Saunders, 1992. — P. 134.
20. Scholtes M.C.W., Behrend C., Dietzel-Dahmen J. et al. Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rate // Fertil. and Steril. — 1998. — 70. — P. 933–937.
21. Стефанович А.В., Барияк И.Р. Проблемы генетического исследования ооцитов и ранних зародышей человека // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 6. — С. 69–76.

Поступила 30.07.03