

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОВТОРНЫХ ВЫКИДЫШЕЙ ПОСЛЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ *IN VITRO* И ЕСТЕСТВЕННОГО ЗАЧАТИЯ ОТ ЖЕНЩИН РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА

Дубинина В.Г.<sup>1</sup>, Носенко Е.Н.<sup>1</sup>, Головатюк Е.П.<sup>2</sup>, Макшаева Э.Т.<sup>2</sup>, Пацкова А.И.<sup>3</sup>, Косюга О.Н.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный медицинский университет, Одесса, e-mail: vladlena.od@gmail.com;

<sup>2</sup>ООО «Медицинский центр репродуктивного здоровья «Гамета»», Одесса;

<sup>3</sup>Университетская клиника «Центр восстановительной и реконструктивной медицины» Одесского национального медицинского университета, Одесса;

<sup>4</sup>КП «ЦГБ № 1», Одесса

Целью исследования стало изучение особенностей кариотипа выкидышей от женщин с повторными самопроизвольными прерываниями беременностей, наступившими после проведения оплодотворения *in vitro* и естественного зачатия в зависимости от возраста. Проведены цитогенетические исследования 440 образцов ворсин хориона от супружеских пар с привычным невынашиванием беременности, среди которых 240 пар с беременностями, наступившими после проведения оплодотворения *in vitro*, и 200 пар с беременностями, наступившими при естественном зачатии. Установлено, что частота выкидышей с аномальным кариотипом после оплодотворения *in vitro* встречается реже по сравнению с таковыми при естественном зачатии в 1,44 раза. Аутосомные трисомии представляют наиболее распространенные хромосомные аномалии выкидышей как после оплодотворения *in vitro*, так и после естественного зачатия. Отличительными чертами выкидышей после оплодотворения *in vitro* по сравнению с такими после естественного зачатия являются большая частота аутосомных трисомий в 1,28 раза и меньшая встречаемость полиплоидий и структурных хромосомных аномалий соответственно в 3,43 и 4,14 раза. В группе женщин 35 лет и старше частота хромосомных аномалий выше таковой у пациенток до 35 лет при оплодотворении *in vitro* в 1,63 раза, а при естественном зачатии – в 1,23.

Ключевые слова: самопроизвольный аборт, оплодотворение *in vitro*, естественное зачатие, выкидыш, ворсины хориона, кариотип, хромосомные аномалии, цитогенетика.

## CYTOGENETIC FEATURES OF ABORTUSES FROM REPEATED MISCARRIAGE AFTER FERTILIZATION IN VITRO AND NATURAL CONCEPTION BY WOMEN OF VARIOUS AGES

Dubinina V.G.<sup>1</sup>, Nosenko E.N.<sup>1</sup>, Golovatyuk E.P.<sup>2</sup>, Makshaeva E.T.<sup>2</sup>, Patskova A.I.<sup>3</sup>, Kosyuga O.N.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Odessa national medical university, Odessa, e-mail: vladlena.od@gmail.com;

<sup>2</sup>Ltd. "Medical Center of Reproductive Health "Gamete", Odessa;

<sup>3</sup>Odessa National Medical University, Odessa;

<sup>4</sup>Municipal enterprise "Clinical City Hospital No. 1", Odessa

The aim of the research was to study the cytogenetic features of the abortuses from repeated miscarriages occurring after the fertilization *in vitro* and natural conception, depending on age. A cytogenetic study of 440 samples of chorionic villi of abortuses from couples with recurrent miscarriage, including 240 pairs with pregnancies occurring after carrying out fertilization *in vitro*, and 200 pairs of pregnancy occur in natural conception. It was found that the incidence of miscarriage with an abnormal karyotype after *in vitro* fertilization is less common compared to those in the natural conception of 1.44 times. Autosomal trisomies are the most common chromosomal abnormalities miscarriages after the fertilization *in vitro*, and after natural conception. The distinctive features of miscarriage after *in vitro* fertilization, compared to those after natural conception are the high frequency of autosomal trisomies in 1.28 times and less occurrence of polyploidy and structural chromosomal abnormalities, respectively, 3.43 and 4.14 times. In the group of women 35 years and older the frequency of chromosomal abnormalities is higher than that in patients under 35 years of *in vitro* fertilization in 1.63 times, while for natural conception – 1.23.

Keywords: spontaneous abortion, fertilization *in vitro*, natural conception, miscarriage, chorionic villi, karyotype, chromosomal abnormalities, cytogenetics.

В первом триместре выкидыш является наиболее распространенным осложнением репродукции человека с частотой в диапазоне между 50 % до 70 % всех зачатий. Около 15 % клинически установленных беременностей приводят к спонтанному аборту в первом триместре [5]. Большинство клинически распознаваемых самопроизвольных прерываний беременности происходят между седьмой и одиннадцатой неделями беременности. Есть несколько основных этиологических факторов, которые могут быть связаны с потерями беременности: генетические, эндокринные, иммунологические, экологические, инфекционные [11].

В парах, которые страдают от повторяющихся самопроизвольных абортов, распространенность хромосомных аномалий варьирует от 2 до 8 % [9]. Клинические результаты дисбалансов кариотипа, как правило, смертельны для развития эмбриона, что приводит к повторяющимся самопроизвольным абортам или к ранней неонатальной смертности [9].

Особенно это касается женщин старше 35 лет, как при экстракорпоральном оплодотворении, так и при интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ) [1]. Другие исследователи указывают на отсутствие повышенного риска хромосомных аномалий в связи оплодотворением *in vitro* за исключением большого числа половых хромосомных аномалий в группе ИКСИ с мужским бесплодием, то есть эти изменения могут быть связаны с родительскими аномалиями, а не с самой процедурой ИКСИ [3]. В исследованиях В. Bingol et al. (2012) [8], А.А. Pendina et al. (2014) [1] не было найдено никакой разницы в спектре аномалий кариотипа выкидышей между женщинами, которые зачали через оплодотворение *in vitro*, и теми, кто зачал естественно. Некоторые исследования показали повышенный риск выкидыша и числа анеуплоидий при увеличении возраста родителей [1, 10].

Целью исследования стало изучение особенностей кариотипа выкидышей от женщин с повторными самопроизвольными прерываниями беременностей, наступившими после проведения оплодотворения *in vitro* и естественного зачатия в зависимости от возраста.

### **Материал и методы**

Проведено цитогенетические исследования 440 образцов ворсин хориона от супружеских пар с привычным невынашиванием беременности, среди которых 240 пар с беременностями, наступившими после проведения оплодотворения *in vitro* (группа I), и 200 пар с беременностями, наступившими при естественном зачатии (группа II). В зависимости от возраста в группах I и II выделены группы IA (n = 122) и IIA (n = 118), в которых возраст женщин был меньше 35 лет; группы IB (n = 118) и IIB (n = 82), где возраст женщин был не менее 35 лет.

Диагноз привычного невынашивания беременности выставлялся на основании наличия у женщин из обследованных супружеских пар самопроизвольных аборт при беременностях, наступивших при естественном зачатии и / или в циклах оплодотворения *in vitro*. Биохимические беременности не учитывались.

Во избежание загрязнения материнской крови, образцы abortивного материала, содержащие ворсины хориона, промывали трижды в физиологическом растворе. Полученный препарат ворсин хориона (5–10 мг) помещали в чашку Петри диаметром 40 мм с раствором Хэнкса с гепарином (25000 ед. / 5 мл) и с пенициллином (50 ME) и стрептомицином (25 мг) на 500 мл среды (при +37 °С). Под контролем бинокулярной лупы отбирали ворсины и их фрагменты, отмывали от крови и помещали во флакон с гипотоническим раствором (5 мл) и колхицином (конечная концентрация – 2,5 мкг / мл). Гипотоническую обработку 0,9 % раствором цитрата натрия осуществляли при комнатной температуре или 35–40 мин. при +37 °С. При префиксации удаляли пипеткой 2–3 мл гипотонического раствора, добавляли по каплям такой же объем свежеприготовленного фиксатора (абсолютный метанол, ледяная уксусная кислота), встряхивая флакон, затем – струйно. Префиксацию проводили 45–90 мин. при комнатной температуре.

Для фиксации пипеткой удаляли весь префиксирующий раствор. Во флакон с ворсинками наливали 4–5 мл холодного фиксатора. Фиксацию проводили 1–2 часа при + 4 °С. В чистый пенициллиновый флакон наливали 3–4 мл свежего фиксатора, помещали в него ворсинку (2–3 мг) и добавляли равный объем дистиллированной воды. Через 2–5 мин., когда ворсинки опускались на дно, их извлекали пинцетом, высушивали на фильтровальной бумаге и переносили на чистое обезжиренное стекло, подогретое над пламенем спиртовки до + 40–50 °С, в каплю 60 %-ной уксусной кислоты. Мацерацию и выход клеток наблюдали с помощью инвертирующего микроскопа. Через 3–5 минут, покачивая стекло, добивались равномерного распределения суспензии на поверхности. Избыток суспензии с остатками исследуемого образца переносили на следующее предметное стекло. На препарат наносили 0,3–0,5 мл фиксатора, высушивали.

Окрашивание хромосом проводили стандартным GTG-методом. Препараты хромосом помещали в 0,25 % раствор трипсина на 10–30 с при комнатной температуре, затем трижды промывали в этиловом спирте с концентрацией 70 °, 96 ° и 100 °, с экспозицией не менее 30 с в каждом растворе. Полученные препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре. Для окраски препаратов применяли 5 % раствор красителя Гимзы, приготовленного на фосфатном буфере (рН 6,8). Процедура окрашивания продолжалась 4–5 мин. Затем препараты промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Микроскопический анализ метафазных пластинок проводили при увеличении 1 000 с использованием микроскопа Axiorplan 2 фирмы Zeiss. Отбор метафазных пластинок и анализ хромосом осуществляли согласно общепринятым критериям [6].

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программы EXCEL.

### **Результаты и их обсуждение**

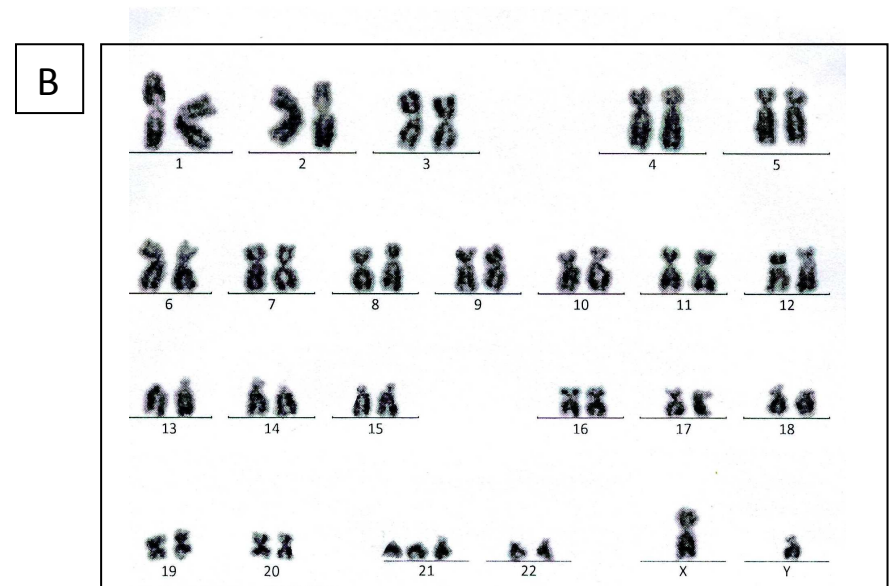
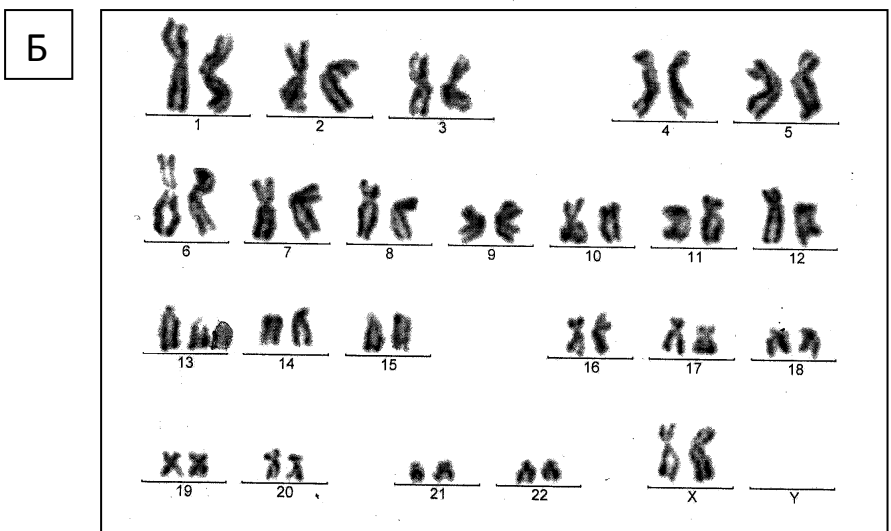
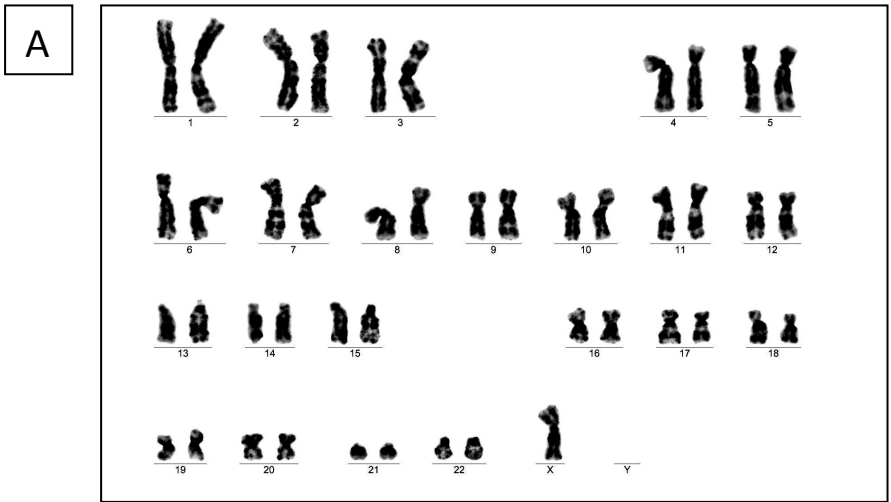
Средний возраст пациентов групп I ( $33,98 \pm 0,26$  лет) и II ( $33,59 \pm 0,29$  лет), IA ( $30,94 \pm 0,27$  лет) и IIА ( $30,91 \pm 0,26$  лет), IB ( $37,11 \pm 0,21$  лет) и IIБ ( $37,25 \pm 0,37$  лет) достоверно не отличался, что позволило в дальнейшем сравнивать полученные результаты.

Цитогенетический анализ продуктов зачатия показал, что 46,25 % (111/240) выкидышей после оплодотворения *in vitro* и 67,00 % (134/200) после естественного зачатия имели аномальный кариотип ( $p < 0,01$ ) (рис.). Таким образом, частота самопроизвольного прерывания беременности вследствие аномалий кариотипа при естественном зачатии была выше таковой при ИКСИ в 1,44 раза (ОШ= $2,36 \pm 0,20$ , 95 % ДИ: 1,60–3,48). Известно, что аномалии кариотипа при потерях беременности возникают из-за ошибок в гаметогенезе, оплодотворении и дроблении [1, 3-5]. Поэтому полученные данные можно объяснить тем, что при искусственном оплодотворении выполняется отбор ооцитов, сперматозоидов, эмбрионов и проводится предимплантационная генетическая диагностика. Ряд сравнительных исследований подтвердил, что исключение при оплодотворении *in vitro* анеуплоидных эмбрионов для переноса может улучшить имплантацию, снизить уровень самопроизвольных аборт и избежать рождения детей с числовыми хромосомными аномалиями после искусственного оплодотворения [7].

Анализ по возрастным группам показал, что в группе женщин 35 лет и старше частота хромосомных аномалий была выше таковой у лиц до 35 лет при оплодотворении *in vitro* в 1,63 раза (57,63 % (68/118) против 35,25 % (43/122),  $p < 0,01$ ; ОШ= $2,50 \pm 0,27$ ; 95% ДИ: 1,48-4,21), а при естественном зачатии достоверно не отличалась (75,61 % (62/82) против 61,02 % (72/118),  $p > 0,05$ ). Среди пациенток моложе 35 лет хромосомные аномалии при естественном зачатии встречались в 1,74 раза чаще, чем при оплодотворении *in vitro* (61,02 % (72/118) против 35,25 % (43/122),  $p < 0,01$ ; ОШ= $2,88 \pm 0,27$ ; 95 % ДИ: 1,70-4,86), а среди лиц 35 лет и старше – в 1,31 (75,61 % (62/82) против 57,63 % (68/118);  $p < 0,03$ ; ОШ= $2,28 \pm 0,32$ ; 95 % ДИ: 1,22–4,25).

По данным литературы, влияние возраста матери на кариотип плода обуславливается следующими факторами: различные повреждающие моменты, скрыто увеличивающие частоту хромосомных аномалий в плодном яйце; события, происходящие в гонадах плода, влияющие на профазные взаимодействия между гомологичными хромосомами; длительная остановка профазы у женщин, способствующая анеуплоидии из-за возрастного распада

компонентов мейотического механизма; экологические факторы, воздействующие на нескольких различных стадиях оогенеза и благоприятствующие формированию аномалий кариотипа [12].



*Цитогенетические исследования ворсин хориона: А – моносомия по X хромосоме; Б – трисомия по хромосоме 13; В – трисомия по хромосоме 21*

Среди выявленных аномальных кариотипов аутосомные трисомии составили среди выкидышей после оплодотворения *in vitro* 75,68 % (84/111) и после естественного зачатия – 58,96 % (79/134) ( $p < 0,01$ ; ОШ=2,17±0,28; 95% ДИ: 1,25-3,77); множественные трисомии – соответственно 6,31 % (7/111) и 4,48 % (6/134) ( $p > 0,05$ ); дисомии X – 2,70 % (3/111) и 0,75% (1/134) ( $p > 0,05$ ); моносомии X – 4,50 % (5/111) и 4,48 % (6/134) ( $p > 0,05$ ); моносомии 21 – 1,80 % (2/111) и 0,75 % (1/134) ( $p > 0,05$ ); полиплоидии – 6,31 % (7/111) и 21,64 % (29/134) ( $p < 0,01$ ; ОШ=4,10±0,44; 95% ДИ: 0,41,72-9,78); структурные хромосомные аномалии – 1,80 % (2/111) и 7,46 % (10/134) ( $p < 0,05$ ; ОШ=4,40±0,79; 95% ДИ: 0,94-21,50); маркерная хромосома – 0,90 % (1/111) и 1,49 % (2/134) ( $p > 0,05$ ). Таким образом, достоверными цитогенетическими особенностями выкидышей после оплодотворения *in vitro* по сравнению с такими после естественного зачатия были: большая частота аутосомных трисомий в 1,28 раза и меньшая встречаемость полиплоидий и структурных хромосомных аномалий соответственно в 3,43 и 4,14 раза.

Статистически достоверной разницы в распределении частот аномальных кариотипов среди выкидышей от женщин моложе и старше 35 лет как после оплодотворения *in vitro*, так и после естественного зачатия не выявлено, что совпадает с данными [2]. Зарегистрированы некоторые особенности частоты встречаемости трисомий в зависимости от возраста: среди исследуемых пациенток с выкидышами после оплодотворения у женщин до 35 лет наиболее часто встречались по мере убывания трисомия 13, 22, 15 и множественные трисомии, а у женщин 35 лет и старше – трисомия 16, 15, 22, 21; среди испытуемых с выкидышами после естественного зачатия у женщин до 35 лет наиболее частыми трисомиями по мере убывания были: трисомия 16, 13, 18 и 21, а у женщин 35 лет и старше – 16, 22, 15, 13 и 18.

### **Выводы**

Частота выкидышей после оплодотворения *in vitro* с аномальным кариотипом встречается реже по сравнению с таковыми при естественном зачатии в 1,44 раза. Аутосомные трисомии представляют наиболее распространенные хромосомные аномалии выкидышей как после оплодотворения *in vitro*, так и после естественного зачатия. Отличительными чертами выкидышей после оплодотворения *in vitro* по сравнению с такими после естественного зачатия являются большая частота аутосомных трисомий в 1,28 раза и меньшая встречаемость полиплоидий и структурных хромосомных аномалий соответственно в 3,43 и 4,14 раза. В группе женщин 35 лет и старше частота хромосомных

аномалий выше таковой у пациенток до 35 лет при оплодотворении *in vitro* в 1,63 раза, а при естественном зачатии достоверно не отличается.

### Список литературы

1. A comparative cytogenetic study of miscarriages after IVF and natural conception in women aged under and over 35 years / A. A. Pendina, O. A. Efimova, O. G. Chiryaeva [et al.] // J. Assist. Reprod Genet. – 2014. – Vol. 31, № 2. – P.149-155. doi: 10.1007/s10815-013-0148-1.
2. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors // Ch.-W. Jia, Li Wang, Y.-L. Lan [et al.] // Chin. Med. J. (Engl). – 2015. – Vol. 128, № 20. – P. 2772–2776. doi: 10.4103/0366-6999.167352.
3. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population / Werner M., Reh A., Grifo J. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2012. – Vol. 29, № 8. – P.817-820. doi: 10.1007/s10815-012-9781-3.
4. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment / Kim J. W., Lee W. S., Yoon T. K. [et al.] // BMC Med. Genet. 2010. – Vol. 11 : 153. Published online 2010 November 3. doi: 10.1186/1471-2350-11-153.
5. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in northeastern Iran / Ghazaey S., Keify F., Mirzaei F. [et al.] // Int. J. Fertil. Steril. – 2015. – Vol. 9, № 1. – P.47-54.
6. Chromosome abnormalities identified in 457 spontaneous abortions and their histopathological findings / Yakut S.1., Toru H.S., Çetin Z. [et al.] // Turk. Patoloji Derg. – 2015. – Vol. 31, № 2. – P.111-118. doi: 10.5146/tjpath.2015.01303.
7. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial / Staessen C., Platteau P., Van Assche E. et al. // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, № 12. – P. 2849-2858.
8. Comparison of chromosomal abnormality rates in ICSI for non-male factor and spontaneous conception / Bingol B., Abike F., Gedikbasi A. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2012. – Vol. 1. – P.25–30. doi: 10.1007/s10815-011-9646-1.
9. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in southern region of India: report and review / Dutta U.R., Rajitha P., Pidugu V.K. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2011. – Vol. 28, № 2. – P.145-149.
10. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring / R. Sharma, A. Agarwal, V. K. Rohra [et al.] // Reprod. Biol.

Endocrinol. – 2015. – Vol. 13: 35. Published online 2015 April 19. doi: 10.1186/s12958-015-0028-x.

11. Kushnir V. A. Aneuploidy in abortuses following IVF and ICSI / V. A. Kushnir, J. L. Frattarelli // J. Assist. Reprod. Genet. – 2009. – Vol. 26, № 2-3. – P. 93-97. doi: 10.1007/s10815-009-9292-z.

12. Nagaoka So I. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem / So I. Nagaoka, T. J. Hassold, P. A. Hunt // Nat. Rev. Genet. – 2012. – Vol. 13, № 7. – P. 493–504. doi: 10.1038/nrg3245.