

Т.Н.Ким¹, С.Т.Абимульдина², И.Г.Ким¹

¹Медицинский центр репродукции человека «ЭКОЛАЙФ», Астана;

²Павлодарский государственный университет им. С.Торайгырова
(E-mail: irina_kim_225@mail.ru)

Влияние полиморфных вариантов хромосом на результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий

В результате цитогенетического обследования пациентов в программах экстракорпорального оплодотворения, обратившихся в Медицинский центр «ЭКОЛАЙФ» за период 2009–2015 гг. мы выделили группу супружеских пар, в которых один или оба супруга имеют в кариотипе хромосомный полиморфизм, и проследили эффективность программ с применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Оценка качества эмбрионов позволяет предположить, что наличие хромосомного полиморфизма в кариотипе влияет на процесс деления клетки и развития эмбриона, что приводит к снижению эффективности процедур ВРТ в исследуемой группе по сравнению с контрольной группой пациентов с нормальным кариотипом.

Ключевые слова: бесплодие, репродуктивная медицина, вспомогательные репродуктивные технологии, кариотипирование, хромосомный полиморфизм, гетерохроматин, эмбрионы.

В последние годы проблема бесплодия становится все более актуальной, в связи с чем понятие «репродуктивная медицина» уже прочно вошло в профессиональный обиход. Репродуктивная медицина — направление, решающее проблемы планирования семьи и деторождения, возникшее на стыке многих наук: гинекологии, андрологии, генетики, биологии и цитологии.

Прогрессивным этапом лечения бесплодия явилось внедрение в клиническую практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), позволяющих реализовать функцию рождения детей при заболеваниях, которые ранее считались абсолютно неизлечимыми. ВРТ включают в себя методы терапии бесплодия, при которых этапы зачатия и раннего развития эмбриона осуществляются вне организма.

Неотъемлемой частью обследования пациентов перед применением процедур ВРТ стало стандартное исследование кариотипа лимфоцитов периферической крови. Исследование кариотипа позволяет выявить носительство сбалансированных хромосомных перестроек, числовые аномалии половых хромосом, мозаицизм, сверхчисленные маркерные хромосомы, а также высокий процент хромосомных изменений, приходящихся на хромосомный полиморфизм (ХП) [1, 2].

Хромосомный полиморфизм является одной из отличительных особенностей кариотипа человека. Под полиморфизмом понимают нормальную изменчивость хромосомного набора, которая заключается в различиях между гомологичными хромосомами по отдельным сегментам, районам и даже целым плечам. К полиморфным вариантам относят такие изменения хромосом, которые сохраняются в процессе онтогенеза, стабильно наследуются при митотическом делении клетки и передаются как простой менделевский признак от родителей к детям, не оказывая влияния на фенотип. Поскольку гетерохроматиновые районы содержатся во всех хромосомах, существование различных вариантов характерно практически для каждой хромосомы человека, а неограниченное число сочетаний таких вариантов приводит к уникальности кариотипа каждого человека, за исключением монозиготных близнецов [3].

Молекулярной основой хромосомного полиморфизма является изменение содержания в хромосоме дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с многократно повторяющимися нуклеотидными последовательностями. Большая часть такой ДНК лишена транскрипционной активности, т.е. не участвует в реализации генетической информации и составляет обедненные структурными генами гетерохроматиновые районы хромосом. Вариабельность именно этих районов хромосом является главной причиной хромосомного полиморфизма, чем и объясняется отсутствие неблагоприятного влияния ХП на фенотип организма.

Представления о природе хромосомного полиморфизма развивались по мере внедрения новых методов исследования хромосом. Первые сведения о вариабельности хромосом человека по величине и форме были получены в конце 50-х начале 60-х годов, когда стали изучать равномерно окрашенные по длине с помощью основных красителей хромосомы в метафазе клеточного деления. Значительно более широкая картина хромосомного полиморфизма открывается при специальных окрасках хромосом.

Хромосомный полиморфизм характеризуется увеличением гетерохроматиновых районов хромосом, а также спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом [4–6].

В кариотипе человека гетерохроматин отмечается во всех хромосомах, но наиболее крупные его блоки и широкий полиморфизм характерны для 1, 9, 16 и Y-хромосом (рис. 1–4).

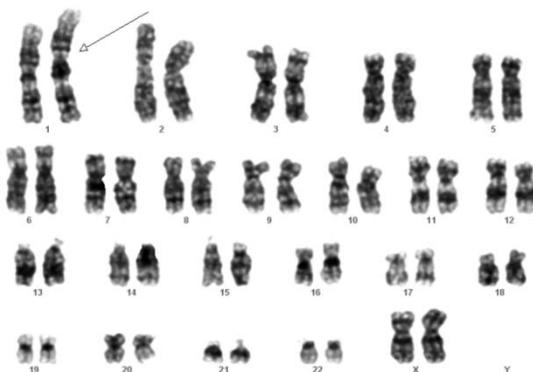


Рисунок 1. Женский кариотип, увеличение длины гетерохроматинового района в длинном плече хромосомы 1 (46, XX,1qh+)

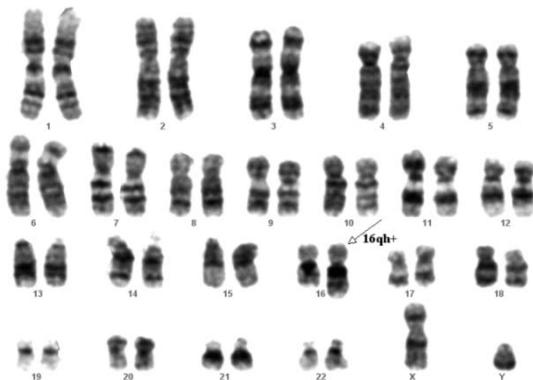


Рисунок 2. Мужской кариотип, увеличение длины гетерохроматинового района в длинном плече хромосомы 16 (46, XY,16qh+)

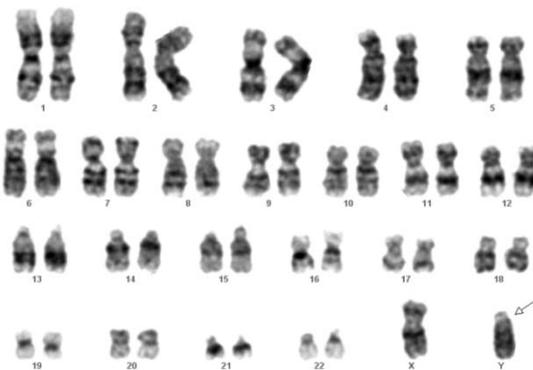


Рисунок 3. Мужской кариотип, увеличение длины гетерохроматинового района в длинном плече Y-хромосомы (46, X, Yqh+)

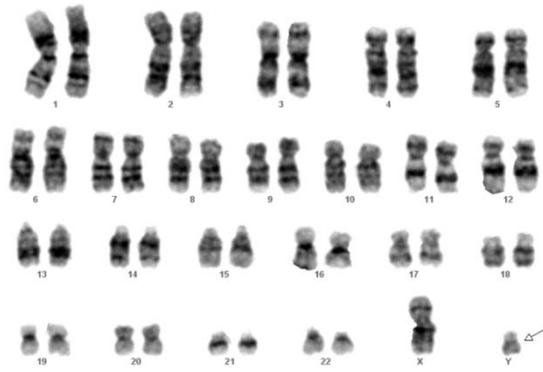


Рисунок 4. Мужской кариотип, уменьшение длины гетерохроматинового района в длинном плече Y-хромосомы (46, X, Yqh-)

Увеличение спутников и спутничных нитей затрагивает акроцентрические хромосомы 13, 14, 15, 21 и 22 (рис. 5–8).

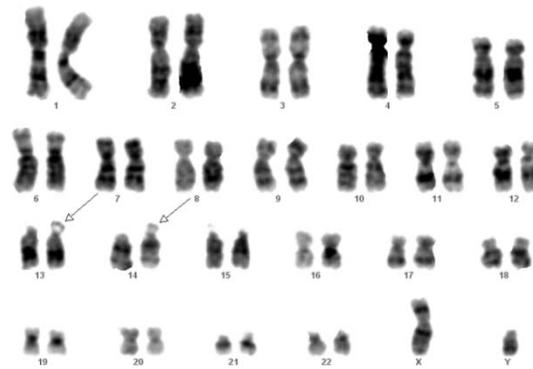


Рисунок 5. Мужской кариотип, увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 13, увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 14 (46, XY,13ps+,14ps+)

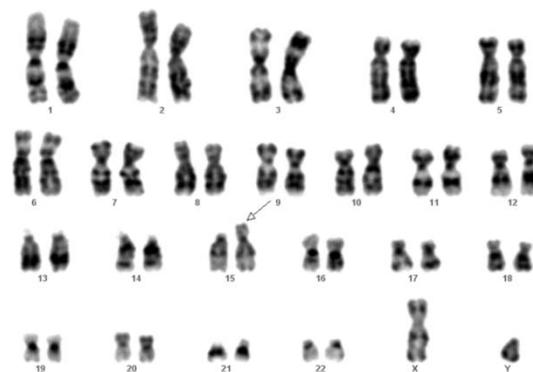


Рисунок 6. Мужской кариотип, увеличение длины спутничных нитей и спутников на коротком плече хромосомы 15 (46, XY,15pstk+ps+)

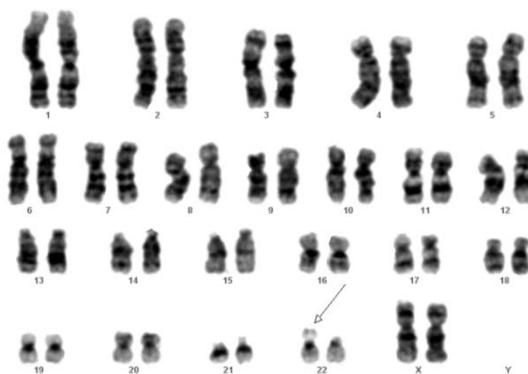


Рисунок 7. Женский кариотип, увеличение длины спутничных нитей и спутников на коротком плече хромосомы 22 (46, XX,22pstk+ps+)

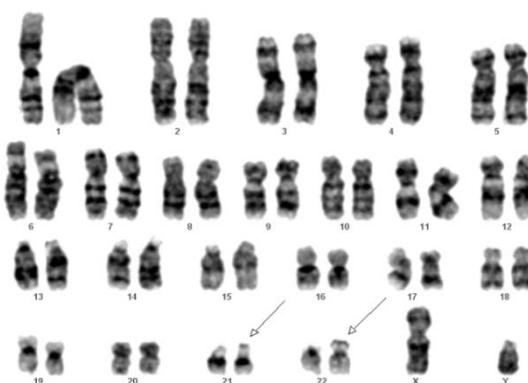


Рисунок 8. Мужской кариотип, увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 21, увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 22 (46, XY,21ps+,22ps+)

В настоящее время биологическое значение хромосомного полиморфизма остаётся не выясненным, поскольку недостаточно выяснена биологическая роль гетерохроматина. Имеются основания предполагать, что эта часть генома важна как для нормальной реализации генетической программы индивидуального развития организма с момента его зарождения, так и для адаптации биологического вида к окружающей среде. Не установлено также, какой уровень содержания гетерохроматина не имеет последствий для генетического здоровья.

Однако повышенная частота переменных хромосом обнаруживается при цитогенетическом исследовании плодного материала при замерших беременностях и самопроизвольных выкидышах, у новорожденных с множественными врожденными пороками развития и у пациентов с хромосомными болезнями (синдром Дауна, Шерешевского-Тернера, Клайнфельтера и др.).

Считается также, что полиморфный гетерохроматин может нарушать процесс сегрегации (расхождения) и конъюгации (спаривания) хромосом в мейозе, что приводит к образованию несбалансированных (анеуплоидных) гамет, а особенности строения гетерохроматина могут оказывать существенное влияние на функционирование генов, расположенных рядом. Клинически это может проявляться хромосомными болезнями у потомства, бесплодием, привычным невынашиванием, замершими беременностями, многократными неудачными попытками ЭКО [7, 8].

По данным разных авторов, доля хромосомной вариабельности в группе пациентов с нарушением репродуктивной функции составляет от 10 до 22 % [9].

Цель исследования: проанализировать влияние хромосомного полиморфизма на результативность процедур ВРТ.

Материалы и методы исследования

Нами проведен ретроспективный анализ результатов стандартного кариотипирования лимфоцитов периферической крови по архивной документации генетической лаборатории Медицинского центра репродукции человека «ЭКОЛАЙФ». За период с 2009 по 2015 гг. проведено цитогенетическое обследование 2976 пациентов в программах ВРТ, из них 1651 — женщина и 1325 — мужчин. В данной выборке ХП явился наиболее частой (364 случая) цитогенетической находкой и составил 13 % (рис. 9).



Рисунок 9. Результаты кариотипирования пациентов (n=2976) в программе ЭКО в МЦ «ЭКОЛАЙФ» за период 2009–2015 гг.

Увеличение гетерохроматиновых участков аутосом 1, 9 и 16, спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом встречалось в 10,2 %, что не противоречит данным других исследователей [9, 10].

У 40 мужчин отмечено значительное увеличение длинного плеча Y-хромосомы (46, X, Yqh+) и в 23 случаях уменьшение длинного плеча Y-хромосомы (46, X, Yqh-). Таким образом, у 4,7 % обследованных мужчин обнаружено изменение гетерохроматиновых районов Y-хромосомы [4, 11].

Мы выделили группу циклов, в которых один или оба супруга имели в кариотипе варибельность тех или иных хромосом и проследили эффективность программ ВРТ. Из них: 33 цикла — ХП в кариотипе женщины, 44 цикла — ХП в кариотипе мужчины, 5 циклов — полиморфные варианты хромосом у обоих супругов. У 10 пациентов выявлен полиморфизм по двум хромосомам. Наиболее часто встречался полиморфизм 22, 21 и 13 хромосом, а также Y-хромосомы (табл. 1).

Таблица 1

Варианты полиморфных хромосом у пациентов исследуемой группы в программах ВРТ

Хромосомы	1	9	13	14	15	16	21	22	Y
Варибельность хромосом									
qh+	6	6				2			11
qh-									7
ps+			12	6	3		12	16	
pstk+			2	1	1		1	5	
ph		4							
cenh+			2		1				

Исследуемая группа была разделена на подгруппы в зависимости от возраста женщины (I — до 35 лет, II — 36–39 лет, III — 40 лет и старше). В качестве контрольной группы методом случайного выбора взято 82 цикла ВРТ с нормальным кариотипом пациентов и соответствующим количеством женщин по возрастным группам. Клинические беременности диагностировали через 3–4 недели после переноса по наличию плодного яйца в полость матки.

Мы не учитывали анамнез, длительность и форму бесплодия, наличие нарушений сперматогенеза, а также, какие именно хромосомы имеют гетерохроматиновый полиморфизм. Основными критериями служили наличие ХП в кариотипе и возраст женщины (от 23 до 43 лет). Полученные эмбриологические данные сопоставлялись с данными частоты наступления беременности в возрастных группах.

Ооциты и эмбрионы культивировали в среде: IVF→ISM1→Blastasist (ORIGIO, Дания). Обработку спермы проводили методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием среды «Sperm preparation» (ORIGIO, Дания). Ооциты оплодотворяли через 3–4 ч после пункции, добавляя 50–100 тысяч подвижных сперматозоидов на ооцит. Через 18–20 ч после оплодотворения ооциты исследовали на наличие пронуклеусов. Дальнейшую оценку дробления и качества эмбрионов проводили через 46–48 ч после оплодотворения на инвертированном микроскопе Olympus IX71 при увеличении S400. Эмбрионы классифицировались согласно числу бластомеров, их равномерности, сферичности и наличию фрагментации (MAX — 7,0 баллов). Перенос проводили на 3–5 день культивирования, для чего отбирали не более 3 эмбрионов с наиболее высокой оценкой качества.

Результаты исследования и обсуждение

Сравнение частоты оплодотворения в исследуемых группах (70,5 %-83 %) статистически достоверных различий не выявило (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Полученные эмбриологические данные и частота наступления беременности в возрастных группах

Возраст женщины	до 35 лет		35–39 лет		40 и старше		Средние данные	
	Пациенты с ХП N=(53)	Контрольная группа N=(53)	Пациенты с ХП N=(19)	Контрольная группа N=(19)	Пациенты с ХП N=(10)	Контрольная группа N=(10)	Пациенты с ХП N=(82)	Контрольная группа N=(10)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Частота оплодотворения, %	80,	83	70,5	82,5	77,6	71,0	76,3	78,9
Количество эмбрионов хорошего качества (6,5–7,0) на один цикл	3,4	5,3	1,6	3,2	0,7	2,2	1,9	3,6
Количество эмбрионов на перенос	2,6	2,2	2,4	2,5	0,7	2,0	2,2	2,2
Перенос эмбрионов на 5 сутки, %	20	55,3	12,5	36,8	0	30	11	37
Количество биохимических беременностей на перенос эмбрионов, %	3,4	64,5	18,8	47	11	20	24,4	43,8
Количество клинических беременностей на перенос эмбрионов, %	37,7	61,5	12,5	47	0	10	18	39,5

Анализ морфологии эмбрионов выявил существенную разницу в количестве качественных эмбрионов на один цикл. В исследуемых подгруппах этот показатель составил в среднем 1,9 (I — 3,4; II — 1,6; III — 0,7), в контрольных подгруппах — 3,6 (I — 5,3; II — 3,2; III — 2,2).

В исследуемых подгруппах культивирование эмбрионов до 5 суток осуществлялось в среднем в 11 % случаев (I — 20,8 %; II — 12,5 %; III — 0 %), в контрольных подгруппах — в 37 % (I — 45,3 %; II — 36,8 %; III — 30 %).

Среднее количество эмбрионов на перенос во всех группах составило 2,2 (1,7–2,6). Частота наступления клинических беременностей в основной группе была значительно ниже во всех возрастных подгруппах (I — 37,7 %; II — 12,5 %; III — 0 %), что в среднем составило 18 %, в контрольных подгруппах — 39,5 % (I — 61,5 %; II — 47 %; III — 10 %).

Таким образом, эффективность программ ВРТ у пациентов в контрольной группе выше на 21,5 %.

Выводы

1. Учитывая низкое качество эмбрионов, можно предположить, что наличие хромосомного полиморфизма влияет на процесс деления клетки и развития эмбриона.
2. При наличии полиморфных вариантов хромосом снижается возможность культивирования эмбрионов до 5-ти суток.
3. Частота наступления беременности статистически ниже у пациентов носителей вариабельных хромосом, по сравнению с контрольной группой пациентов с нормальным кариотипом.
4. Носительство полиморфных вариантов хромосом должно учитываться как фактор риска при медико-генетическом консультировании.
5. Наличие хромосомного полиморфизма в кариотипе у пациентов в рамках программ ВРТ возможно следует относить к хромосомным аномалиям и, учитывая анамнез и форму бесплодия, рекомендовать проведение преимплантационной генетической диагностики.

Список литературы

- 1 Бочков Н.П. Клиническая генетика: учебник. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР Медиа, 2006.
- 2 Генетика: учебник для вузов / Под ред. акад. РАМН В.И.Ивановой. — М.: Академкнига, 2006.
- 3 Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2006. — 640 с.
- 4 Подугольникова О.А и соавт. Гетерохроматические районы хромосом 1,9,16 и Y у человека и фенотип // Генетика. — 1984. — Т. 20. — № 3. — С. 496–500.
- 5 Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. — М.: Наука, 1986. — 430 с.
- 6 Демидова И.А., Ворсанова С.Г. Цитологический и молекулярный полиморфизм гетерохроматиновых районов хромосом человека // Мед. генетика: экспресс-информация. — 1990. — № 12. — С. 1–9.
- 7 Кошелева Н.Г. Невынашивание беременности / Кошелева Н.Г., Плужникова Т.А. // Мир медицины. — 1998. — № 11, 12. — С. 43–46.
- 8 Баранов В.С., Айламазян Э.К. Экологические и генетические причины нарушения репродуктивного здоровья и их профилактика // Журнал акуш. жен. болезн. — 2007. — Т. LVI. — Вып. 1. — С. 3–10.
- 9 Цветкова Т.Г. Полиморфизм хромосом в контингенте супружеских пар с отягощенным акушерским анамнезом: автореф. дис. канд. мед. наук. — М., 1980.
- 10 Барцева О.Б., Пулина Г.А. и др. Цитогенетическое обследование супружеских пар в программе ЭКО // Проблемы репродукции. — 1998. — № 4. — С. 37–38.
- 11 Чистяков В. В., Ладыгина В. В., Безруков Р. В. Цитогенетическое исследование вариабельности гетерохроматиновых районов хромосом у пациентов с проблемами репродукции // Репродуктивная медицина. — 2010. — № 3, 4. — С. 8, 9.

Т.Н. Ким, С.Т. Әбімұлдина, И.Г.Ким

Репродуктивті технологиялар бағдарламалар тиімділігіне хромосомалар полиморфты варианттарының әсері

2009–2015 жыл аралығында «ЭКОЛАЙФ» Медициналық орталығына жүгінген экстракорпоральды ұрықтандыру бағдарламаларында емделушілерді цитогенетикалық зерттеудің нәтижесінде, бізбен некелік жұптар тобы алынды, оның ішінде жұбайлардың біреуінің немесе екеуінің кариотиптерінде хромосомдық полиморфизм анықталды және бағдарламаның тиімділігі көмекші репродуктивті технологияны (КРТ) қолдану арқылы бақыланды. Эмбриондардың сапалығын бағалау, эмбрионның дамуы мен жасушаның бөліну процесіне кариотиптегі хромосомдық полиморфизмнің әсер ететінін болжауға мүмкіндік береді, ол өз алдына кариотипі нормаға сәйкес бақылау емделушілер тобымен салыстырғанда, зерттелуші топтағы КРТ емдік шараларының тиімділігін төмендетті.

T.N. Kim, S.T. Abimuldina, I.G. Kim

The impact of chromosomal polymorphism on the effectiveness of assisted reproductive technologies programs

We carried out cytogenetic screening of patients consulted at the medical centre «Astana EKOLAYF» during the in vitro fertilization programs for the period 2009–2015. We have identified a group of couples in which one or both spouses have a chromosomal polymorphism karyotype and track the effectiveness of programs with the use of assisted reproductive technologies (ART). Assessment of the quality of embryos suggests that the presence of chromosomal polymorphism in the karyotype influence the process of cell division and embryonic development, resulting in lower efficiency of the procedures of ART in the treatment group compared with the control group patients with normal karyotype.

References

- 1 Bochkov N.P. *Clinical genetics: textbook*, 3rd edit., Moscow: GEOTAR-Media, 2000.
- 2 *Genetics: textbook for high schools* / Edit. by the acad. of the RAMS V.I. Ivanova, Moscow: Akademkniga, 2006.
- 3 Baranov V.S., Kuznetsova T.V. *Cytogenetics of human embryo development: the scientific and practical aspects*, Saint-Petersburg: Publ. N-L, 2006, p. 640.
- 4 Podugolnikova O.A. and coauthors. *Genetics*, 1984, 20, 3, p. 496–500.
- 5 Prokofieva-Belgovskaya A.A. *Heterochromatic regions of chromosomes*, Moscow: Nauka, 1986, p. 430.
- 6 Demidova I.A., Vorsanova S.G. *Medical genetics (express information)*, 1990, 12, p. 1–9.
- 7 Kosheleva N.G. *World of Medicine*, 1998, 11, 12, p. 43–46.
- 8 Baranov V.S., Ailamazyan E.K. *Journal of obstetrics and woman disease*, 2007, LVI, 1, p. 3–10.
- 9 Tsvetkova T.G. *Polymorphism of chromosomes in contingent of couples with burdened obstetric anamnesis*: thesis abstract of candidate of medical sciences, Moscow, 1980.
- 10 Bartseva O.B., Pulina G.A. and others. *Reproduction problems*, 1998, 4, p. 37–38.
- 11 Chistyakov V.V., Ladygina V.V., Bezrukov R.V. *Reproductive medicine*, 2010, 3, 4, p. 8, 9.