

УДК 618.2/4-2:618.177

© В. В. Грабарь, А. М. Феськов, Е. С. Жилкова, 2011.

## МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУПРУЖЕСКИХ ПАР С БЕСПЛОДИЕМ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

В. В. Грабарь, А. М. Феськов, Е. С. Жилкова

Центр репродукции человека «САНА-МЕД» (директор – проф. А. М. Феськов), г. Харьков.

### MEDICAL-GENETIC CHARACTERIZATION OF COUPLES WITH INFERTILITY IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS

V. V. Grabar, A. M. Feskov, E. S. Zhilkova

#### SUMMARY

A medico-genetic counseling, a study of karyotype, FISH of sperm nuclei, CFTR, AZF-locus, FMR1, AR genes in 122 couples with a female and 64 with male infertility were done. Revealed that 45.1% of spouses were present disturbances in the reproductive history of the I and II degree relatives. We found a complicated family genetic history in infertile couples, in patients with male infertility congenital and genetic disorders met in 2 times more often. Chromosomal abnormalities were detected in 9.8% of couples with female and 12.5% with male infertility. All men with karyotype abnormalities have the elevated level of aneuploidy of chromosomes X and Y in sperm. Thus, before applying of assisted reproduction technologies in infertile couples a medico-genetic counseling must be done.

### МЕДИКО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДРУЖНИХ ПАР З БЕЗПЛІДДЯМ В ПРОГРАМАХ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

В. В. Грабар, О. М. Феськов, Е.С. Жилкова

#### РЕЗЮМЕ

Проведено медико-генетичне консультування, дослідження каріотипу, ядер сперматозоїдів на наявність анеуплоїдій методом FISH, генів CFTR, AZF-локусу, FMR1, AR у 122 подружніх пар з жіночим і 64 з чоловічим безпліддям. Виявлено, що у 45,1% подружжя були присутні порушення в репродуктивному анамнезі у родичів I і II ступеня споріднення. Нами визначено обтяженість генетичного статусу при безплідді, причому в групі пацієнтів з чоловічим фактором вроджені вади розвитку та генетичні порушення зустрічалися в 2 рази частіше. Хромосомні порушення виявлені у 9,8% подружніх пар з жіночим і 12,5% з чоловічим безпліддям. У всіх чоловіків з аномаліями каріотипу був підвищений рівень анеуплоїдій в сперматозоїдах за хромосомами X і Y. Таким чином, безплідним подружнім парам перед початком програм допоміжних репродуктивних технологій необхідно проводити медико-генетичне консультування.

**Ключевые слова:** бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии, генетический риск.

В современном мире проблема женского и мужского бесплодия во многих случаях решается благодаря методам вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). С применением программ суррогатного материнства шанс иметь ребенка есть даже у женщин с отсутствием или серьезной патологией матки (внутриматочные синехии) [4, 15].

Таким образом, контингент пациентов программ ВРТ достаточно широкий. Наряду с популяризацией методов ВРТ становятся актуальными вопросы изучения генетического риска для детей, рожденных с помощью этих методов.

С одной стороны, контролируемая стимуляция овуляции может оказывать влияние на формирование аномальных гамет [5, 6, 13]. Так, в современной литературе имеются противоречивые данные как об отсутствии существенного влияния ВРТ на частоту рождения плодов с врожденными пороками развития (ВПР), так и о

существовании связи между ВРТ и рождением детей с болезнями геномного импринтинга, такими как синдром Видемана-Беквитта и синдром Ангельмана [11, 12].

С другой стороны, возникновение патологических состояний репродуктивной системы может быть связано с хромосомными аномалиями, генными мутациями и наличием наследственной предрасположенности к заболеванию у родителей [1, 7, 10, 14].

В связи с этим, нашей целью явилось изучение генетических особенностей супружеских пар с бесплодием в программах ВРТ.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были обследованы 186 супружеских пар с бесплодием, включенных в программы ВРТ в 2007-2010 гг. Все пациенты были разделены на две группы.

Группу 1 составили 122 супружеские пары с женским бесплодием различного генеза: трубно-перитонеального – у 37 (30,3%); эндокринного – 49 (40,2%),

при этом гипоталамо-гипофизарная недостаточность была у 7 (5,7%), гипоталамо-гипофизарная дисфункция – у 25 (20,5%), из них у 17 (13,9%) – яичниковая форма, у 8 (6,6%) – надпочечниковая форма; гиперпролактинемия – у 8 (6,6%), гипотиреоз – у 9 (7,4%); эндометриоз выявлен у 30 (24,5%); маточный фактор – у 6 (5,0%), у 3 из них имело место отсутствие матки (у 2 – синдром Рокитанского-Кюстнера-Хайшера, у 1 – экстирпация матки в анамнезе), у 3 пациенток – внутриматочные синехии. Этим парам проводилась программа *in vitro fertilization* (IVF).

Группу 2 составили 64 супружеские пары с мужским фактором бесплодия, этим парам проводились IVF + *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI).

В группе 1 возраст женщин был 26–45 лет, мужчин – 32–55 лет; в группе 2 – соответственно 24–43 и 30–62 года. В возрасте более 35 лет было 58 (47,5%) женщин группы 1 и 30 (46,9%) – группы 2 ( $p < 0,05$ ).

В нашей работе мы применяли медико-генетическое консультирование (МГК) всех супружеских пар с применением генеалогического анализа.

Дополнительно к стандартному обследованию для программы ЭКО были произведены: исследование кариотипа, ядер сперматозоидов методом *fluorescence in situ hybridization* (FISH), генов *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), *azoospermia factor* (AZF)-локуса, *fragile X mental retardation 1* (FMR1), *androgen receptor* (AR).

Цитогенетическое исследование было проведено на препаратах метафазных хромосом, которые получали из лимфоцитов периферической крови, культивируемых в условиях *in vitro*, в соответствии со стандартной методикой [2, 8], хромосомы идентифицировали после дифференцированного окрашивания (С-метод).

Для молекулярно-цитогенетических исследова-

ний препараты клеток эякулята готовили по методу, предложенному в 1994 г. Н. Guttenbach [8], гибридизацию *in situ* проводили в соответствии с протоколом, рекомендуемым фирмой-производителем.

Молекулярно-генетические исследования проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Статистическую обработку результатов проводили по *t*-критерию в компьютерной программе STATISTICA, а также по  $\chi^2$  в компьютерной программе STATGRAF. Достоверными считали различия при значениях с вероятностью  $p \leq 0,5$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение семейного анамнеза супружеских пар, находящихся под наблюдением, позволило обнаружить у 55 (45,1%) пациентов (женщин и мужчин) нарушения в репродуктивном анамнезе у родственников I и II степени родства.

В 1 группе 30 (24,6%) пар имели подобные проблемы: у 10 (8,2%) женщин и у 7 (5,7%) мужчин у родственников отмечено бесплодие, у 7 (5,7%) и 5 (4,1%) – невынашивание беременности, у 1 пациентки у двоюродной сестры – синдром Шерешевского-Тернера (45 X0).

В группе 2 у 19 (29,7%) супружеских пар у родственников I и II степени родства выявлен осложненный репродуктивный анамнез: бесплодие в семьях – у 2 (3,1%) женщин и у 7 (10,9%) мужчин, невынашивание беременности – соответственно у 3 (4,7%) и 5 (7,8%), у 1 пациента родной брат имел полисомию по хромосоме Y (47XY<sup>Y</sup>), у 1 – двоюродный брат страдал муковисцидозом.

При МГК у наблюдаемых нами пациентов 1 и 2 групп были выявлены следующие ВПР и генетические нарушения (табл. 1).

Таблица 1

#### ВПР, моногенные заболевания и генетические варианты, выявленные у пациентов групп 1 и 2

ВПР и генетические нарушения	Женщины	
	Группа 1 (n=122)	Группа 2 (n=64)
Синдром Рокитанского-Кюстнера-Хайшера*	2	–
ВДКН, обусловленная недостаточностью 21-гидроксилазы (мягкая форма) *	2	1
≥ 40 CGG-повторов в гене FMR1	2	–
	Мужчины	
Синдром Юнга*	–	2
Неполный синдром Картагенера*	–	1
Микроделеции AZF-локуса Y-хромосомы	–	2
≥ 30 CAG-повторов в гене AR	–	2
Мутации гена муковисцидоза CFTR	–	2
Поликистоз почек*	–	1

\*Диагноз поставлен на основании клинических и лабораторных признаков.  
Диагноз установлен на основании выявления мутации гена или его полиморфизма молекулярно-генетическими методами.

Как видно из таблицы 1, ВПР и генетические нарушения в 2 раза чаще встречались в группе 2. Отягощенность генетического статуса у бесплодных супругов указывает на важность МГК до начала программ ВРТ. При выявлении генетической патологии пациенты должны быть осведомлены о риске передачи потомству этих нарушений, так как решение о лечении методами ВРТ принимает супружеская пара.

Так, например, наличие динамических мутаций в гене AR-рецептора при количестве САG-тринуклеотидных повторов  $\geq 30$  вызывает нечувствительность тканей к андрогенам с развитием азооспермии, а экспансия САG-тринуклеотидных повторов  $\geq 50$  в последующих поколениях может приводить к рождению мальчиков со спинобульбарной мышечной атрофи-

ей [2]. Возрастание количества CGG-повторов в гене FMR1  $\geq 44$  CGG-повторов сопряжено с преждевременным истощением яичников, а их экспансия до 200 приводит к развитию синдрома Мартина-Бела (ломкой X-хромосомы), наиболее распространенной после синдрома Дауна формы умственной отсталости [3].

Уровень хромосомных изменений у пациентов 2-й группы был выше (12,5% по сравнению с 9,8% в 1 группе,  $p < 0,05$ ) за счет хромосомной патологии у мужчин с азооспермией. Наши данные о высоком уровне хромосомных aberrаций у пациентов с бесплодием по сравнению с общепопуляционными подтверждаются данными других авторов [1, 9, 10, 14].

Результаты цитогенетического исследования пациентов программ ВРТ представлены в таблице 2.

Таблица 2

## Результаты цитогенетического исследования супружеских пар программ ЭКО

Особенности кариотипа	Группа 1 (n=122)		Группа 2 (n=64)	
	женщины	мужчины	женщины	мужчины
Нормальный кариотип	113 (92,5%)	120 (98,4%)	64 (100%)	56 (87,5%)
Аномальный кариотип	9 (7,5%)	2 (1,6%)	–	8 (12,5%)
46XX/45X0	3 (2,5%)	–	–	–
46XX/47 XXX	3 (2,5%)	–	–	–
46XX/47 XXX/45X0	2 (1,6%)	–	–	–
46XX, inv (2)(p12q14)	1 (0,8%)	–	–	–
47 XYY	–	1 (0,8%)	–	1 (1,56%)
46XY, inv (2)(p12q14)	–	1 (0,8%)	–	–
46XY/47 XYY	–	–	–	1 (1,56%)
46XY, inv (3)(p21q12)	–	–	–	1 (1,56%)
46XY/46 XX	–	–	–	1 (1,56%)
46XY, t(13/14)(q10q10)	–	–	–	1 (1,56%)
46XY, t(7/16)(q21q22)	–	–	–	1 (1,56%)
46XY, inv (7)(p11q11)	–	–	–	1 (1,56%)
47XXY/46XY	–	–	–	1 (1,56%)

Таким образом, при анализе данных кариотипа, в группе 1 у женщин обнаружено преобладание хромосомных изменений в комплексе половых хромосом в виде мозаицизма. Хромосомные перестройки аутосом были представлены в 1 наблюдении перичентрической инверсией. У мужчин группы 1 выявлена полисомия хромосомы Y и перичентрическая инверсия.

Исследование кариотипа в группе 2 позволило выявить у 87,5% супружеских пар нормальный кариотип, а у 12,5% пар были выявлены изменения (во всех случаях у мужчин). Результаты исследования показали, что среди хромосомных изменений у мужчин группы 2 обнаруживались перестройки аутосом, представленные транслокациями и перичентрическими инверсиями, также выявлены кариотипы, соответствующие синдрому полисомии хромосомы Y

(полная и мозаичная формы), Клайнфельтера (мозаичная форма), в 1 случае – мозаицизм с присутствием клона клеток с женским кариотипом.

FISH исследование сперматозоидов произведено 85 пациентам групп 1 и 2.

Всего из 1 группы было обследовано 27 мужчин. Средняя частота анеуплоидий в сперматозоидах по хромосомам X и Y у мужчин с нормальным кариотипом составила 0,25%, что сравнимо со значением в популяции фертильных мужчин, с нормальными показателями спермограммы ( $< 0,6\%$ ) [9, 10]. У пациента с полисомией хромосомы Y в кариотипе уровень анеуплоидии по хромосомам X и Y в сперматозоидах составил 2,8%, у мужчины с инверсией хромосомы в кариотипе – 0,9% анеуплоидий по хромосомам X и Y.

Из группы 2 было обследовано 58 мужчин. Средняя частота анеуплоидий в сперматозоидах по хро-

мосомам X и Y у мужчин с нормальным кариотипом составила 0,49%. У пациента с мозаичной формой полисомии хромосомы Y в кариотипе доля анеуплоидии по хромосомам X и Y в сперматозоидах составила 0,8%, при инверсиях 3-й и 7-й хромосом в кариотипе – 1,2%; при Робертсоновской транслокации 13/14 – 1,6%, при транслокации 7/16 – 1,4%.

У пациентов в обеих группах с нормальным кариотипом соотношение сперматозоидов с хромосомой X к сперматозоидам с хромосомой Y было 1:1. Выявленная в сперматозоидах хромосомная патология была представлена нерасхождением хромосом XY, XX, YY.

Таким образом, хромосомные aberrации могут явиться одной из причин, приводящей к бесплодию, и, как следствие, у этих пациентов могут формироваться гаметы с хромосомными aberrациями. Исследования сперматозоидов пациентов с аномалиями в кариотипе методом FISH позволили выявить высокую частоту анеуплоидий гоносом, что подтверждает существование интерхромосомного эффекта, когда независимо от того, какие хромосомы вовлечены в хромосомные aberrации, в кариотипе в процессе мейоза могут происходить нарушения расхождения любых других хромосом [9, 14]. Таким образом, у пациентов с изменениями в кариотипе могут формироваться гаметы с мутациями *de novo*, использование которых в программах ВРТ может привести к рождению ребенка с генетической патологией.

#### ВЫВОДЫ

1. Беременности, полученные с помощью ВРТ, требуют большей генетической настороженности.
2. Супружеским парам, участвующим в программах ВРТ, необходимо проводить МГК и генетическое обследование.
3. При выявлении хромосомной патологии у родителей целесообразно применять предимплантационную диагностику для профилактики рождения больного потомства.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глинкина Ж. И. Цитогенетическое обследование супружеских пар, включенных в программы вспомогательных репродуктивных технологий / Ж. И. Глинкина, Л. Н. Кузьмичев, В. В. Мамонова // *Акушерство и гинекология*. – 2010. – № 3. – С. 39–42.
2. Горбунова В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных болезней / В. Н. Горбунова, В. С. Баранов. – СПб.: Спецлитература, 1997. – 286 с.
3. Лившиц А. Б. Генетические аспекты преждевременного истощения яичников / А. Б. Лившиц,

Л. А. Лившиц, С. А. Кравченко // *Медицинские аспекты здоровья женщины*. – 2006. – № 1. – С. 24–28.

4. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия. Теоретические и практические подходы: руководство / под ред.: В. И. Кулакова, Б. В. Леонова. – 2-е изд., доп. – М.: МИА, 2004. – 781 с.

5. Assisted reproductive technologies and risk of birth defect – a systematic review / M. Hansen, C. Bower, E. Milne [et al.] // *Human Reproduction*. – 2005. – Vol. 20 (8). – P. 328–338.

6. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States / J. Reefhuis, M. A. Honein, L. A. Schieve [et al.] // *Human reproduction*. – 2009. – Vol. 24, № 2. – P. 360–366.

7. Claustres M. Molecular pathology of CFTR locus in male infertility / M. Claustres // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2005. – № 10. – P. 14–41.

8. Czepulkowski B. Analyzing chromosomes / Czepulkowski B. – London: Bios Scie. Publ. Limit, 2001. – 205 p.

9. Egozcue S. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. / S. Egozcue, J. Blanco, J. Vendrell // *Human Reproduction Update*. – 2000. – № 6 (1). – P. 93–105.

10. Linden M.G. Genetic Counseling for Sex Chromosome Abnormalities / M. G. Linden, B. G. Bender, A. Robinson // *American Journal of Medical Genetics*. – 2002. – Vol. 110. – P. 3–10.

11. Lucifero D. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology / D. Lucifero, J. R. Chaillet, J. M. Trasler // *Human reproduction update*. – 2004. – Vol. 10, № 1. – P. 3–18.

12. Manipalviratn S. Imprinting disorders and assisted reproductive technology / S. Manipalviratn, A. DeCherny, J. Segars // *Fertility and sterility*. – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 305–315.

13. Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction / D. El-Chaar, Q. Yang, J. Gao [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2008. – Vol. 92, № 5. – P. 1557–1561.

14. Silber S. G. Transmission of male infertility to future generations lessons from Y-chromosome / S. G. Silber, S. Repping // *Human Reproduction Update*. – 2002. – Vol. 8, № 3. – P. 217–229.

15. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives / ed.: D. K. Gardner, A. Weissman, C. M. Howles, Z. Shoham. – [2<sup>nd</sup> ed.]. – London & New York: Taylor Francis Gr., 2004. – 984 p.