

## БИОХИМИЯ

УДК 577.218 (470.331)  
DOI: 10.26456/vtbio315

### **ИССЛЕДОВАНИЕ КАРИОТИПОВ У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ**

**П.В. Голубкина, А.Н. Панкрушина**  
Тверской государственной университет, Тверь

Исследование проводилось в течение двух лет на базе генетической лаборатории ООО «Медикал Геномикс» в г. Тверь. В ходе исследования проведён анализ 227 эмбрионов на наличие различных хромосомных аномалий. Для получения геномных профилей проводили подготовку геномных библиотек и секвенирование методом NGS. Полученные данные сгруппированы с учётом полового кариотипа эмбрионов, а также с учётом возраста матери на момент потери беременности. Для каждой группы получено процентное соотношение по типам хромосомных аномалий и распределение частот мутаций в хромосомах. Выявлены общие закономерности и различия в частотах и формах трисомий и моносомий, наиболее часто встречающиеся мутации, в том числе, в половых хромосомах. Выявлены изменения частот мутаций у плода в возрастном аспекте матери.

**Ключевые слова:** кариотип, хромосомные аномалии, анеуплоидии, эмбрион человека, абортивный материал, геномный профиль, метод NGS.

**Введение.** Проблема невынашивания беременности является одной из наиболее важных в области современной репродуктивной медицины. Согласно статистическим данным, случаи невынашивания от общего числа зарегистрированных беременностей составляют от 15% до 25% (Подкаменева, 2019). Так как около 50%, а по некоторым данным – до 80%, самопроизвольных абортов (выкидышей) происходит в первом триместре беременности, предполагают ещё большее их количество на доклиническом этапе (Berghella, 2012). Понимание причин столь распространённого явления важно для последующих исследований и разработок в данной области, для предупреждения самопроизвольного аборта у женщин при планировании беременности, а также для сохранения здоровья женщины и ребёнка, и для контроля за рождаемостью в целом.

Целью исследования было установить возможные генетические причины остановившихся в развитии беременностей и

самопроизвольных абортов как наиболее распространённых случаев невынашивания.

**Методика.** Исследование проводилось на базе лаборатории «Медикал Геномикс», г. Тверь в течение двух лет (2020 – 2022 гг.). В ходе исследования изучен плодный материал (хорион, ткани плода) 227 эмбрионов на сроке от 3 до 20 недель развития (Ткаченко, 2021). Возраст женщин, у которых производился забор биоматериала, варьируется от 20 до 46 лет. Все данные пациенток были обезличены.

На начальном этапе проводили отбор биоматериала плодного происхождения при помощи стереоскопического микроскопа Микромед МС-1 (рис. 1), а также забор крови у женщин с помощью вакуумной системы для забора крови Vacuette (объёмом 4 мл с ЭДТА-К3). Для выделения ДНК из плодного материала и крови матери применялся колоночный метод с использованием набора «QIAamp Fast DNA Tissue Kit» производства QIAGEN. Полученные образцы ДНК амплифицировали с помощью набора реагентов для ПЦР «VeriFiler Express PCR Amplification Kit» производства Thermo Fisher Scientific, далее секвенировали при помощи генетического анализатора Applied Biosystems 3500 производства Thermo Fisher Scientific. Проводили сравнение полученных профилей ДНК матери и плода по 25 локусам при помощи прилагающегося программного обеспечения GeneMapper. На данном этапе проводилась проверка на контаминацию полученных проб ДНК материнским материалом, а также проверка родства во избежание возможных ошибок.

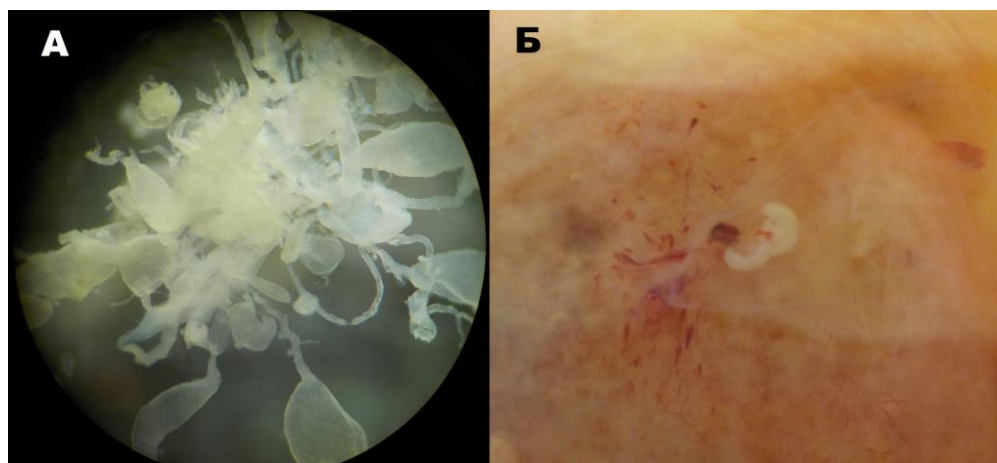


Рис. 1. Образцы плодного материала: А – ворсины хориона в растворе DPBS при 2-кратном увеличении микроскопа «Микромед» МС-1; Б – эмбрион человека на 3-4 неделе развития

На следующем этапе исследования проводили подготовку геномных библиотек с использованием полученных образцов ДНК

плодного материала, для чего использовали набор «VeriSeq PGS Library Prep Kit» производства Illumina. Далее подготавливали пул геномных библиотек и осуществляли секвенирование методом NGS. Для секвенирования использовали набор реагентов «MiSeq Reagent Kit v3 – PGS» и секвенатор MiSeq System производства Illumina. Анализ «сырых» данных проводили с помощью прилагающегося программного обеспечения BlueFuse Multi Software, с помощью которого получали геномные профили для интерпретации результатов анализа (рис. 2).

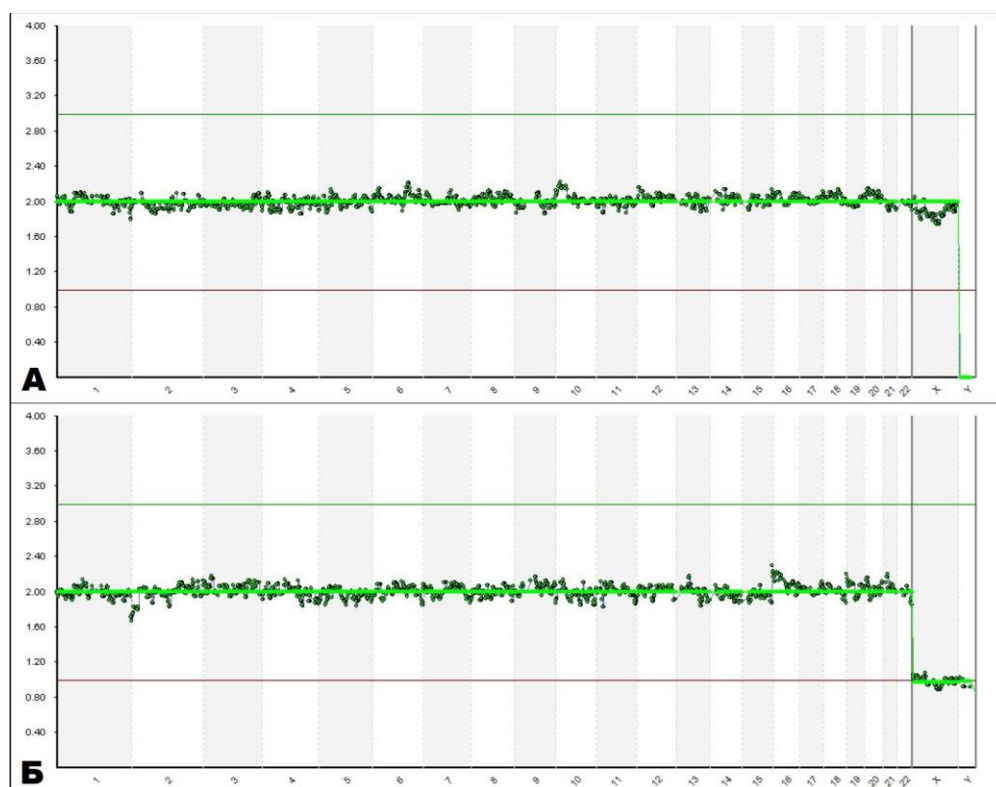


Рис. 2. Примеры геномных профилей, полученных при помощи ПО «BlueFuse Multi Software»: А – женский геномный профиль без анеуплоидий (1-22, X)x2; Б – мужской геномный профиль без анеуплоидий (1-22)x2,(X,Y)x1

Для оценки частот хромосомных аномалий полученные результаты были распределены по половому и возрастному принципам. В первом случае были выделены две группы, в которые вошли данные по эмбрионам с женским и мужским половыми кариотипами, а также третья группа, включающая данные по эмбрионам неопределённого пола, которые имели аномалии в половых хромосомах (Ли, 2019). Количество случаев в группах составило 80 (XX), 110 (XY) и 37 (X/Y/0), соответственно. При распределении по

возрастному принципу были получены две группы. В первую группу вошли случаи, в которых возраст матери на момент потери беременности составлял от 20 до 34 лет, во вторую – от 35 до 46 лет. Количество случаев в каждой группе составило 123 и 102, соответственно. При данном распределении не были учтены 2 случая, которые не соответствовали необходимым критериям отбора (Никитина, 2018).

Для каждой группы было подсчитано количественное и процентное соотношение эуплоидных и анеуплоидных кариотипов, а также получено распределение частот обнаруженных мутаций по хромосомам. Оценка достоверности различий полученных частот проводилась с использованием критерия хи-квадрат Пирсона ( $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$ ).

**Результаты и обсуждение.** При распределении по половому признаку были получены следующие результаты:

Группа 1 (эмбрионы с женским половым кариотипом) – количество эуплоидных эмбрионов составило 37 (46.25%), анеуплоидных – 43 (53.75%). Среди анеуплоидных эмбрионов обнаружены следующие хромосомные аномалии (ХА): трисомии – 40 (93.02%), моносомии – 1 (2.33%), мозаицизм – 1 (2.33%), рекомбинантная хромосома (делеция и дупликация различных участков одной хромосомы) – 1 (2.33%). Установленные случаи моносомии, мозаицизма и рекомбинантной хромосомы представлены ХА по 21, 19 и 8 хромосомам, соответственно; все установленные случаи трисомии в данной группе были представлены ХА по одной хромосоме в кариотипе (рис. 3). Частота ХА в данной группе распределена следующим образом (рис. 4): 10 случаев по 16 хромосоме (23.26%); 7 – по 22 хромосоме (16.28%); 5 – по 21 хромосоме (11.63%); 4 – по 15 хромосоме (9.3%); 3 – по 8 хромосоме (6.98%); 2 – по 4, 7, 10 и 13 хромосомам (4.65%), 1 – по 1, 6, 9, 12, 18 и 19 хромосомам (2.33%). В данной группе не было зарегистрировано ХА по 2, 3, 5, 11, 14, 17 и 20 хромосомам.

Группа 2 (эмбрионы с мужским половым кариотипом) – количество эуплоидных эмбрионов составило 51 (46.36%), анеуплоидных – 59 (53.64%). Среди анеуплоидных эмбрионов обнаружены следующие ХА: трисомии – 54 (91.53%), мозаицизм – 2 (3.39%), моносомии – 1 (1.69%), делеции – 1 (1.69%), рекомбинантная хромосома – 1 (1.69%). Установленные случаи мозаицизма представлены ХА по 10 и 18 хромосомам, моносомии – по 21 хромосоме, делеции и рекомбинантной хромосомы – по 8 хромосоме (рис. 3).

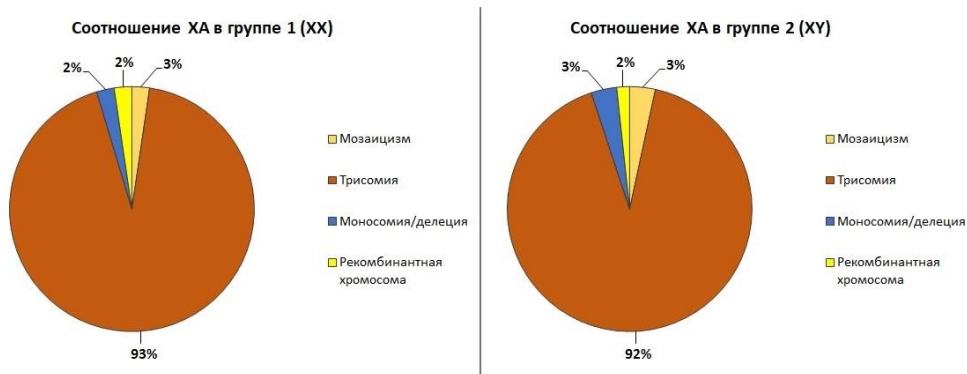


Рис. 3. Сравнение графиков соотношения типов хромосомных аномалий в группах с женским (группа 1) и мужским (группа 2) половым карิโอотипом

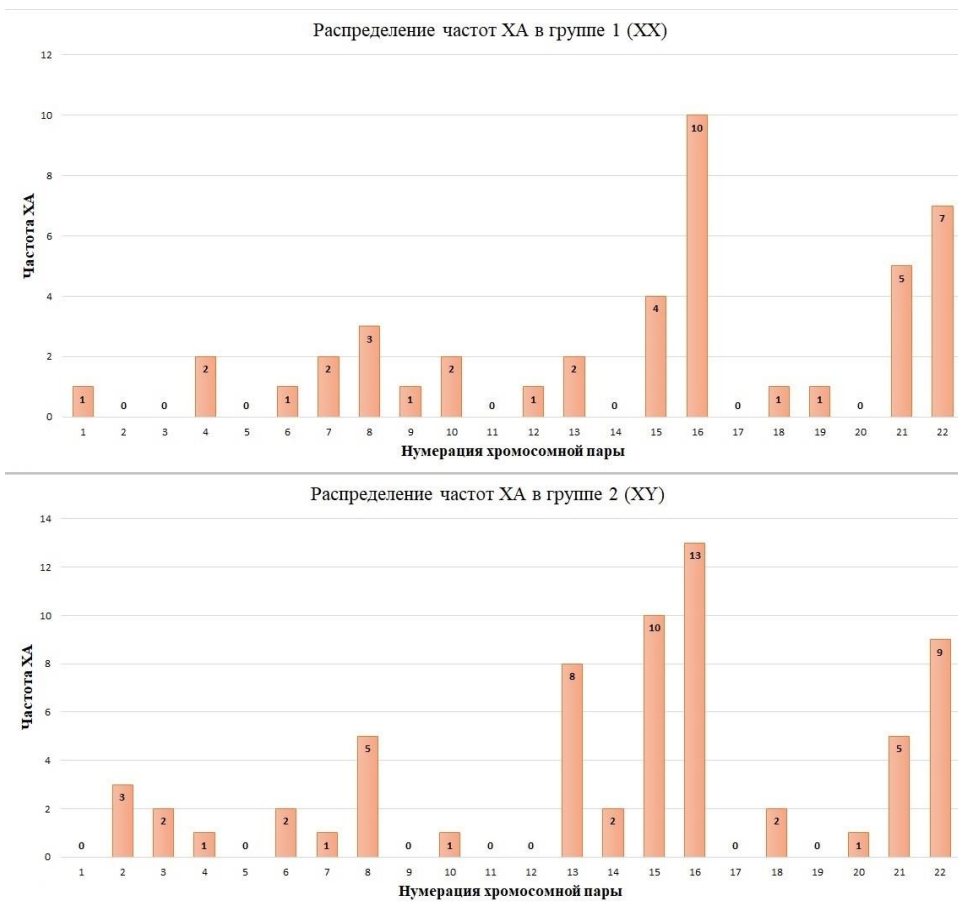


Рис. 4. Сравнение графиков распределения частот ХА по хромосомным парам в группах 1 и 2.

Среди установленных случаев трисомии обнаружено 6, включающих ХА по двум хромосомам в карิโอотипе (10.2% от числа

кариотипов с ХА), что повлияло на определение общего процентного соотношения ХА по хромосомам в данной группе. Частоты ХА в данной группе распределены следующим образом (рис. 4): 13 случаев по 16 хромосоме (20%); 10 – по 15 хромосоме (15.38%); 9 – по 22 хромосоме (13.85%), 8 – по 13 хромосоме (12.31%), 5 – по 8, и 21 хромосомам (7.69%); 3 – по 2 хромосоме (4.62%), 2 – по 3, 6, 14 и 18 хромосомам (3.08%); 1 – по 4, 7, 10 и 20 хромосомам (1.54%). В данной группе не было зарегистрировано ХА по 1, 5, 9, 11, 12, 17 и 19 хромосомам.

Группа 3 (эмбрионы с неопределённым половым кариотипом) – в силу специфики мутаций в данную группу вошли только анеуплоидные эмбрионы. Среди эмбрионов данной группы обнаружены следующие ХА: моносомия по X-хромосоме (утрата одной из половых хромосом) – 20 (54.05%), триплоидии – 13 (35.14%), мозаицизм половых хромосом – 4 (10.81%). Все случаи мозаицизма половых хромосом представлены ХА по X-хромосоме, однако в одном из них данная мутация сочетается также с мозаицизмом по 2 хромосоме (рис. 5).

**Соотношение ХА в группе с неопределённым половым кариотипом**

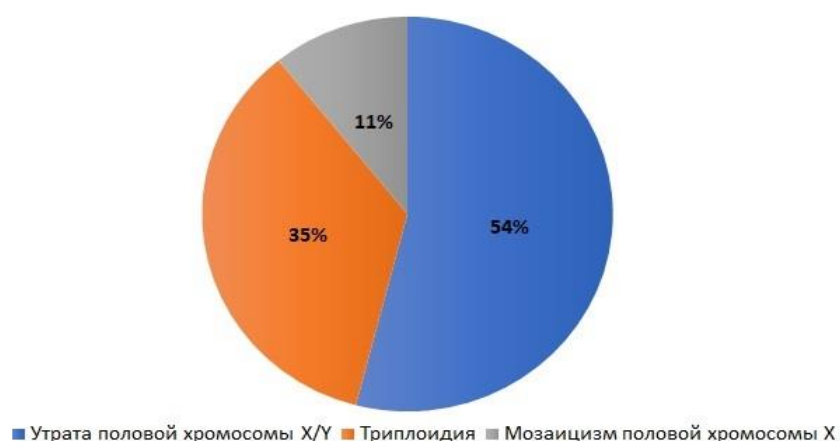


Рис. 5. Соотношение типов ХА в группе 3

При распределении по возрастному признаку были получены следующие результаты:

Группа I (от 20 до 34 лет) – количество эуплоидных эмбрионов составило 53 (43.09%), анеуплоидных – 70 (56.91%). Соотношение полов в данной группе распределено следующим образом: эмбрионы женского пола (XX) – 41 (44.57%), мужского (XY) – 55 (59.78%), неопределённого пола (X/Y) – 27 (29.35%). Среди анеуплоидных

эмбрионов обнаружены следующие ХА: трисомии – 40 (56.34%), триплоидии – 12 (16.9%), моносомии по X-хромосоме – 12 (16.9%), мозаицизм – 6 (8.45%), делеции – 1 (1.41%). Установленные случаи мозаицизма представлены ХА по 2, 10, 18 и 19 хромосомам, а также по X-хромосоме, случаи делеции – по 8 хромосоме, случаев моносомии аутосом в группе не выявлено. В данной группе зарегистрирован 1 случай комбинированных трисомий. Частота ХА в данной группе распределена следующим образом (рис. 6): 15 случаев мутаций по X-хромосоме (20.55%); 12 – триплоидии (16.44%); 11 – по 16 хромосоме (15.07%); 8 – по 22 хромосоме (10.96%); 5 – по 15 хромосоме (6.85%); 4 – по 13 хромосоме (5.48%); 3 – по 2 хромосоме (4.11%); 2 – по 3, 6, 7, 8 и 10 хромосомам (2.74%); 1 – по 1, 4, 18, 19 и 21 хромосомам (1.37%). В данной группе не было зарегистрировано ХА по 5, 9, 11, 12, 14, 17 и 20 хромосомам.

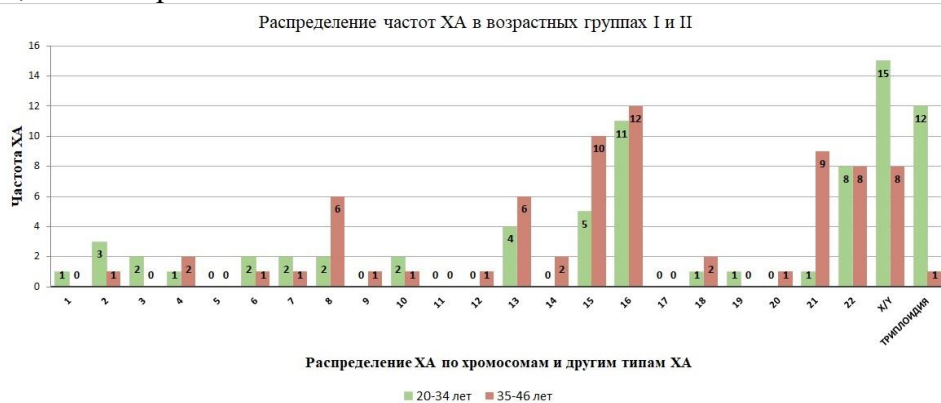


Рис. 6. Распределение частот ХА в группах I и II

Группа II (от 35 до 46 лет) – количество эуплоидных эмбрионов составило 34 (33.33%), анеуплоидных – 68 (66.67%). Соотношение полов в данной группе распределено следующим образом: эмбрионы женского пола (XX) – 39 (38.24%), мужского (XY) – 54 (52.94%), неопределённого пола (X/Y) – 9 (8.82%). Среди анеуплоидных эмбрионов обнаружены следующие ХА: трисомии – 60 (82.19%), моносомии – 9 (12.33%), рекомбинантная хромосома – 2 (2.74%), триплоидии – 1 (1.37%), мозаицизм – 1 (1.37%). Установленные случаи моносомии в 2 случаях представлены ХА по 21 хромосоме (2.74% от общего числа), в 7 – по X-хромосоме (9.59%). Единственный случай мозаицизма представлен также ХА по X-хромосоме. Оба случая рекомбинантной хромосомы, как было отмечено выше, представлены ХА по 8 хромосоме. В данной группе зарегистрировано 5 случаев комбинированных трисомий. Частота ХА в данной группе распределена следующим образом (рис. 6): 12 случаев по 16

хромосоме (16.44%); 10 – по 15 хромосоме (13.7%); 9 – по 21 хромосоме (12.33%); 8 – моносомии по X-хромосоме, а также ХА по 22 хромосоме (10.96%); 6 – по 8 и 13 хромосомам (8.22%); 2 – по 4, 14 и 18 хромосомам (2.74%); 1 – триплоидии, а также ХА по 2, 6, 7, 9, 10, 12 и 20 хромосомам. В данной группе не было зарегистрировано ХА по 1, 3, 5, 11, 17 и 19 хромосомам.

**Заключение.** В группах 1 и 2 (женский и мужской половые кариотипы) было получено идентичное распределение кариотипов на эуплоидные и анеуплоидные практически в равных соотношениях с некоторым смещением (~5%) в сторону анеуплоидий. Также в обеих группах преобладают случаи трисомии (~90%); случаи мозаицизма, моносомий, делеций и рекомбинантных хромосом имеют малую долю и приблизительно равное распределение в общем количестве (~2-5%). Наибольшая частота ХА в обеих группах выявлена по 16 хромосоме, ХА по 15, 21 и 22 хромосомам также являются наиболее распространёнными. Не выявлено ни одного случая ХА по 5, 11 и 17 хромосомам. Стоит отметить, что все анеуплоидные кариотипы с комбинациями трисомий по различным хромосомам обнаружены в группе 2 (с мужским половым кариотипом) ( $p \leq 0.05$ ). Группа 3 (неопределённый половой кариотип) представлена в основном кариотипами с моносомией и мозаицизмом по X-хромосоме. В данном исследовании не было выявлено сочетания ХА половых хромосом с трисомией, моносомией и другими типами ХА аутомом, кроме единственного случая сочетания с мозаицизмом 2 хромосомы.

При распределении данных по возрастному принципу было обнаружено, что доля эуплоидных кариотипов значительно меньше во II группе (>10%). Полученный результат соответствует известным данным о том, что вероятность появления ХА с возрастом повышается. При этом доля ХА в половых хромосомах уменьшается в более поздней возрастной группе (>14%), доля женских и мужских кариотипов, соответственно, повышается. Во II группе достоверно повышается ( $p \leq 0.01$ ) доля трисомий (>29%), значительно снижается доля триплоидий (>17%;  $p \leq 0.01$ ) и мозаицизма (>10%;  $p \leq 0.05$ ). Также стоит отметить достоверное увеличение частоты ХА по 21 хромосоме ( $p \leq 0.01$ ). В целом, среди аутомом в обеих возрастных группах преобладают ХА по 16, 15 и 22 хромосомам. Оба случая рекомбинантной 8-й хромосомы зарегистрированы также в более поздней возрастной группе, однако в I группе выявлен случай делеции 8 хромосомы.

*Авторы выражают благодарность генетической лаборатории ООО «Медикал Геномикс» (г. Тверь) за консультирование по вопросам исследования и за помощь в анализе полученных данных.*



### **Список литературы**

- Никитина Т.В.* 2018. Неслучайное распределение кариотипов эмбрионов у женщин с привычным невынашиванием беременности / Т.В. Никитина, Д.И. Жигалина, Е.А. Саженова и др. // Медицинская генетика. Т. 17. № 1. С. 50-56.
- Панкрушина А.Н., Калиничева И.А.* 2021. Неинвазивное исследование генетических аномалий эмбрионов человека // Вестн. Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. № 4 (64). С. 33-40.
- Подкаменева Т.В.* 2019. Невынашивание в первом и во втором триместрах беременности / Т.В. Подкаменева, В.В. Флоренсов, О.Е. Баряева, М.Ю. Ахметова, Н.В. Бурдукова, Д.А. Ступин, Е.И. Иванова. Иркутск: ИГМУ. 58 с.
- Ткаченко Л.В.* 2021. Невынашивание беременности / Л.В. Ткаченко, Н.Д. Углова, Н.И. Свиридова, Т.И. Костенко, И.А. Гриценко, Т.В. Складановская. Волгоград: Изд-во ВолГМУ. 60 с.
- Berghella V.* 2012. Early pregnancy loss / Obstetric Evidence Based Guidelines. 2nd ed. P. 142–149.
- Hartwell L.* 2010. Genetics: from genes to genomes. 4 th edition. McGraw-Hill Education. 379 p.
- Hogge W.A.* 2003. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions // Am. J. Obstet. Gynaecol. V. 189. № 2. P. 397-402.
- Prager S.* 2020. Pregnancy loss (miscarriage): Risk factors, etiology, clinical manifestations, and diagnostic evaluation [Electronic resource] / S. Prager, E. Vicks, V. Datton. URL: <https://www.uptodate.com/contents/pregnancy-loss-miscarriage-riskfactors-etiology-clinical-manifestations-and-diagnostic-evaluation>.
- Recurrent pregnancy loss: Guideline of the European Society of Reproduction and Embryology.* 2017 [Electronic resource] /European Society of Reproduction and Embryology early pregnancy development group. URL: <http://eshre.eu/guidelines-andlegal/guidelines/>.
- Sahoo T.* 2016. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits and challenges / T. Sahoo, N. Dzidic, M. N. Strecker et al. // Genet Med. V. 19. № 1. P. 83-89.

## **THE STUDY OF HUMAN EMBRYO KARYOTYPES AT MISCARRIAGE**

**P.V. Golubkina, A.N. Pankrushina**  
Tver State University, Tver

The study of human embryo karyotypes at miscarriage was carried out at the genetic laboratory LLC "Medical Genomics" in Tver for over 2 years. The analysis of 227 embryos for the presence of various chromosomal abnormalities was conducted. To obtain genomic profiles, genomic libraries

were prepared, and sequencing was performed using the NGS method. The data was grouped taking into account the sex of the embryos, as well as the age of the mother at the time of pregnancy loss. For each group, the percentage ratio of types of chromosomal abnormalities and the distribution of mutation frequencies in chromosomes were defined. General patterns, differences in the frequencies and forms of trisomies and monosomies and the most common mutations were identified, including those in sex chromosomes. Changes in mutation frequencies in the fetus were identified in relation to the maternal age aspect.

**Keywords:** *karyotype, chromosomal abnormalities, aneuploidies, human embryo, abortion tissue, genomic profile, the NGS method.*

*Об авторах:*

ГОЛУБКИНА Полина Владиславовна – магистрант 2 курса биологического факультета по направлению 06.04.01 Биология, (программа «Медико-биологические науки»), ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33; e-mail: pol8199@yandex.ru.

ПАНКРУШИНА Алла Николаевна – доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии и физиологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33; e-mail: Pankrushina.AN@tversu.ru.

Голубкина П.В. Исследование кариотипов у эмбрионов человека при невынашивании беременности / П.В. Голубкина, А.Н. Панкрушина // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2023. № 3(71). С. 17-26.

Дата поступления рукописи в редакцию: 02.08.23

Дата подписания рукописи в печать: 04.09.23