

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему **«ОСОБЛИВОСТІ ХРОМОСОМНОГО НАБОРУ ХОРІОНА ПРИ
ЗАВМЕРЛИХ ВАГІТНОСТЯХ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем
Карпенко Тетяна Андріївна

Керівники:

Бадюк В.М.,
доцент, кандидат медичних наук,
завідувач клініко-діагностичної
лабораторії

Білько Н. М.,
доктор медичних наук, професор, зав.
кафедри лабораторної діагностики
біологічних систем НаУКМА

Рецензент:

Микитенко Д.О.
доктор медичних наук, доцент

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
« ____ » червня 20__ року

ЗМІСТ

Стор.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Невиношування вагітності	7
1.1.1. Поняття невинишування та поширеність серед населення.....	7
1.1.2. Основні причини невинишування вагітності.....	9
1.1.3. Генетичні аспекти невинишування.	10
1.2. Дослідження абортного матеріалу при репродуктивних втратах.....	12
1.2.1. Ворсини хоріона як основний об'єкт дослідження.	12
1.2.2. Прямий і непрямий методи дослідження ворсин хоріона: переваги та недоліки.	14
1.2.3. Принцип методу FISH для дослідження хромосомного набору хоріона. .	16
1.3. Проблема мозаїцизму при дослідженні абортного матеріалу	18
1.3.1. Поняття обмеженого плацентарного мозаїцизму та його типи.	18
1.3.2. Діагностика ОПМ та його вплив на внутрішньоматковий розвиток плода.	20
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	23
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	23
2.1. Схема експерименту та об'єкт дослідження.....	23
2.2. Витратні матеріали, реактиви та обладнання необхідні для дослідження....	24
2.3. Підготовка розчинів	27
2.4. Методи дослідження	29
2.4.1. Метод довгострокового культивування клітин ворсин хоріона (непрямий метод).....	29
2.4.1.1. Підготовка суспензії мезенхімальних клітин ворсин хоріона, посадка та культивування.	29
2.4.1.2. Фіксація культури мезенхімальних клітин ворсин хоріона.	31

2.4.1.3. Виготовлення препаратів.	32
2.4.2. Прямий метод дослідження ворсин хоріона	33
2.4.2.1. Фіксація трофобластних клітин ворсин хоріона.....	33
2.4.2.2. Виготовлення препаратів.	34
2.4.3.Забарвлення препаратів G-методом та їх аналіз.	35
2.4.4. Метод флуоресцентної гібридизації <i>in situ</i> (FISH).	36
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	39
3.1. Удосконалення методики довгострокового культивування ворсин хоріона	39
3.1.1. Зміни початкового протоколу для збільшення продуктивності методу. ..	39
3.1.2. Можливість застосування методу для дослідження біоптату хоріона.	42
3.2. Частоти хромосомних аберацій серед досліджених зразків абортного матеріалу.....	43
3.2.1. Частоти хромосомних аберацій серед зразків, досліджених прямим методом та методом FISH.....	43
3.2.2. Частоти хромосомних аберацій серед зразків, досліджених непрямим методом.....	45
3.3. Виявлення явища обмеженого плацентарного мозаїцизму	49
3.3.1. Порівняння результатів досліджень, отриманих прямим та непрямим методами, та методом FISH.	49
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	52
ВИСНОВКИ	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ОПМ	– обмежений плацентарний мозаїцизм
УЗД	– ультразвукове дослідження
EDTA	– етилендіамінтетраоцтова кислота (<u>E</u> thylen <u>e</u> diamin <u>e</u> tetraacetic <u>a</u> cid)
FISH	– флуоресцентна гібридизація in situ (<u>F</u> luorescence <u>I</u> n <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization)
ISCN	– міжнародна система для номенклатури в цитогенетиці людини (An <u>I</u> nternational <u>S</u> ystem for Human <u>C</u> ytogenetic <u>N</u> omenclature)
MEM	– мінімальне поживне середовище (<u>M</u> inimal <u>E</u> ssential <u>M</u> edium)
SGA	– низька маса для відповідного гестаційного терміну (<u>S</u> mall for <u>G</u> estational <u>A</u> ge)

ВСТУП

Проблема невиношування вагітності на сьогоднішній день стоїть доволі гостро, адже одна із чотирьох жінок зазнає спонтанного викидня, тобто 15-20% усіх вагітностей перериваються з різних причин на різних термінах [1]. При цьому ця патологія не має тенденції до зниження, не зважаючи на численні та високоефективні методи діагностики й лікування, розроблені останніми роками [2]. З огляду на це невиношування є важкою психологічною і соціальною проблемою як для жінок, так і для їх партнерів і найближчих родичів.

Невиношування вагітності – це самовільне (спонтанне) передчасне переривання вагітності в терміні від зачаття до 37 повних тижнів, яке відбувається як результат комплексної реакції жіночого організму на будь-яке неблагополуччя в стані здоров'я власне вагітної, плода, навколишньому середовищі тощо [3,4]. Найбільша кількість репродуктивних втрат відбувається на ранніх термінах – в першому триместрі – і може досягати 50-80% [1].

Найпоширенішою причиною такої патології є генетичні аномалії плода, саме тому цитогенетичні дослідження абортного матеріалу є надзвичайно актуальними і мають важливе клінічне значення. По-перше, встановлення каріотипу плода допомагає виключити генетичний фактор із переліку імовірних причин невиношування і шукати проблеми в інших напрямках – інфекції, гормональні та імунологічні порушення тощо. По-друге, вносить значний вклад у планування наступної вагітності, в залежності від встановлення типу хромосомної аномалії: чи це патологія, яка виникла *de novo*, чи спадкова. Окрім того, існування явища обмеженого плацентарного мозаїцизму, тобто наявності хромосомних аберацій лише в провізорних тканинах плода, робить необхідним визначення каріотипу одразу декількох клітинних ліній: цитотрофобласту, мезенхімальної стромы та власне плода для уникнення постановки хибно позитивного або хибно негативного результату цитогенетичних досліджень абортного матеріалу.

Метою цієї роботи було встановити хромосомний набір ворсин хоріона з абортного матеріалу прямим методом, методом довгострокового культивування і методом FISH та порівняти отримані результати для встановлення частоти різних хромосомних аберацій, пов'язаних із перериванням вагітності, а також виявлення явища обмеженого плацентарного мозаїцизму.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. відпрацювати метод довгострокового культивування мезенхімальних клітин ворсин хоріона;
2. визначити хромосомний набір ворсин хоріона, використовуючи прямий метод і метод FISH;
3. порівняти дані, отримані прямим методом та FISH, із даними, отриманими при довгостроковому культивуванні;
4. встановити частоти хромосомних аберацій, що призводять до невиношування вагітності;
5. виявити наявність/відсутність випадків обмеженого плацентарного мозаїцизму.

У якості об'єкта дослідження слугував абортний матеріал (хоріон), отриманий в результаті завартої вагітності у жінок. Предметом дослідження був каріотип трофобластних клітин та клітин мезенхімальної строми ворсин хоріона.

Роботу виконано на базі Клініко-діагностичної лабораторії ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Невиношування вагітності

1.1.1. Поняття невиношування та поширеність серед населення.

Невиношування вагітності – це її самовільне (спонтанне) переривання від моменту зачаття до 37 повних тижнів або 259 днів від останньої менструації [3]. Загалом така патологія розглядається як універсальна інтегрована відповідь жіночого організму на будь-яке неблагополуччя в стані здоров'я вагітної, плода, навколишнього середовища та багатьох інших факторів [3,4].

Термін «невиношування» застосовується до багатьох ускладнень вагітності на ранніх термінах, тому в 2005 році Європейською Асоціацією Репродукції та Ембріології Людини (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE) було переглянуто термінологію і встановлено, що втрата вагітності, яка виникає після позитивного аналізу сечі на хоріонічний гонадотропін людини (ХГЛ) або ж у разі виявлення підвищеного рівня β -ХГЛ в сироватці крові, але до підтвердження факту вагітності гістологічно або за допомогою УЗД, класифікується як «біохімічна втрата». Здебільшого це відбувається у терміні вагітності до 6 тижнів і часто така вагітність залишається взагалі нерозпізнаною. Термін «клінічне невиношування» застосовується лише у випадку наявності внутрішньоматкової вагітності, яка була підтверджена гістологічно або за допомогою УЗД [1] (рис.1.1.).

У структурі клінічного невиношування розрізняють: а) ранній самовільний аборт – відбувається до 12 тижня вагітності; б) пізній самовільний аборт – між 12 і 22 тижнями та в) переривання вагітності в терміні від 22 до 27 тижня. Вирізняють також передчасні пологи – це переривання вагітності після 28 тижня [1,3,4].

Частота невиношування вагітності становить від 10 до 30% від загального числа вагітностей, тобто кожна четверта жінка зазнає викидня [1,5]. При цьому

ця патологія не демонструє тенденції до зниження, не зважаючи на численні та високоефективні методи діагностики й лікування, що були розроблені впродовж останніх років [2,3,6–8]. Цей відсоток також корелює з віком вагітних. Так, серед жінок віком 20-24 роки він становить 10% та зростає до 51% серед жінок 40-44 років [1].



Рис.1.1. Піраміда структури невиношування. Адаптовано згідно з [1]: вважається, що близько 70% вагітностей закінчуються викиднем. Більшість із них стається до моменту клінічного встановлення вагітності (нижче горизонтальної лінії).

Найбільша кількість репродуктивних втрат відбувається у першому триместрі – до 80%, в той час як в другому й третьому – 18-20% та 7-30% відповідно [3,4,8]. Критичними термінами в першому триместрі вважаються 6-8 тиждень (загибель ембріона) та 10-12 тиждень (експульсія плода) [8].

В структурі невиношування вагітності виділяють також звичне невиношування - це наявність трьох або більше спонтанних викиднів в анамнезі жінки [3,9]. Частота даної патології становить 5-20%. При цьому ризик втрати другої вагітності після перенесеного викидня становить 13-17%, третьої – 36-38%, а четвертої – 40-45% [8].

Одним із патогенетичних варіантів невиношування вагітності є завмерла вагітність, яку підрозділяють на: а) анембріонію – відсутність ембріона в порожнині плідного яйця після 7-го тижня вагітності та б) загибель ембріону (плода). Частота випадків завмерлої вагітності становить за різними даними від 45 до 88,6% від загального числа всіх ранніх самовільних абортів [10].

1.1.2. Основні причини невиношування вагітності. До основних причин невиношування вагітності відносять імунологічні порушення, нейроендокринні фактори, інфекційні захворювання, тромбофілічні фактори, вади розвитку статевих органів, пухлини матки, травматичні ушкодження, екстрагенітальні захворювання, ураження рецепторного апарату ендометрію, генетичні фактори, ускладнення вагітності та соціальні фактори [1,6,8,11] (рис.1.2).

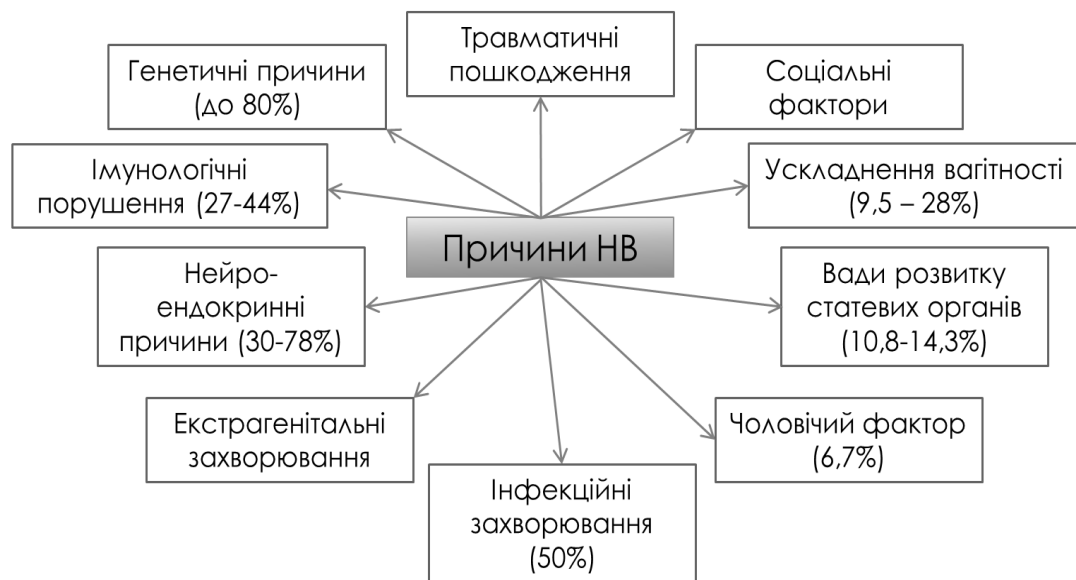


Рис.1.2. Основні причини невиношування вагітності.

Частота анатомічних аномалій серед жінок із невиношуванням становить від 10 до 16%. До цієї групи відносять вроджені аномалії розвитку матки, набуті анатомічні дефекти та істміко-цервікальну недостатність [11]. Ендокринні причини становлять від 8-20%, найбільш значущими є дисфункція щитоподібної залози, недостатність лютеїнової фази, гіперандрогенія, цукровий діабет [1,3,11].

До основних причин невиношування можна віднести також інфекційно-запальні захворювання, хронічні або ж ті, які протікають латентно, та захворювання, що виникають на ранніх термінах вагітності. Вважається, що активація цитокінів та вільних радикалів, яка відбувається під час інфікування організму вагітної, може спричиняти пряму цитотоксичність; токсичні продукти мікроорганізмів можуть призводити до порушення цілісності плідних оболонок, а підвищення температури вище 39°C може мати тератогенний і ембріоцидний ефект і сприяти перериванню вагітності на будь-якому терміні [3].

Проте, безумовно, однією з найважливіших причин репродуктивних втрат є хромосомні аномалії плода, що зустрічаються в 50-80% випадків. При цьому чим меншим є термін вагітності, тим вищою є ймовірність виявлення аберантного каріотипу плода [3,4,10].

1.1.3. Генетичні аспекти невиношування. Близько 50% випадків невиношування вагітності на ранніх термінах пов'язані із генетичними аномаліями ембріону (плода) [3,4,12]. При цьому спостерігається кореляція між терміном вагітності і ймовірністю виявлення хромосомних аномалій в абортному матеріалі: чим менший термін – тим вища ймовірність. Так, частота аномалій при самовільних викиднях на терміні 7-8 тижнів досягає 80%, до 10-го тижня становить 65-70%, до 12-го тижня – 35-45%, а після 16-го – не перевищує 17% [1,9,13–19].

Більшість хромосомних аномалій виникають *de novo* як результат випадкових помилок, що відбуваються в процесі гаметогенезу та ембріогенезу [20]. Наявність хромосомних відхилень у клітинах спричиняє порушення ембріогенезу, що пов'язують із зниженою здатністю таких клітин до поділу. При цьому виникає різка десинхронізація процесів розвитку ембріона, плаценти, індукції диференціювання та міграції клітин [17,21].

До причин хромосомних порушень відносять: 1) порушення мейотичного поділу: нерозходження гомологічних хромосом призводить до моно- або трисомії внаслідок утворення гамети з меншою або більшою кількістю

хромосом; 2) аномальний процес кросинговеру при мейотичному поділі гамет: наприклад, обмін ділянками негомологічних хромосом); 3) порушення мітотичного поділу: при порушеннях сегрегації хромосом під час першого мітозу може виникати повна тетраплоїдія; також можливе виникнення мозаїцизму при ненормальному розходженні хромосом; 4) помилки запліднення: випадки запліднення ооцита двома сперматозоїдами (диспермія), що призводить до формування триплоїдного зародка, можливе також утворення аномальних диплоїдних зародків із набором хромосом, отриманих від одного з батьків (уніпарентальна дисомія) [4,10,21].

Найбільш частими хромосомними аномаліями, що спостерігаються в спонтанних абортусів є трисомії (61,2%) (рис.1.3.). Найпоширенішою трисомією, що виявляється є трисомія за 16, 22 та 21 хромосомами. Загалом в декількох фундаментальних дослідженнях були зареєстровані трисомії усіх аутосомних хромосом, за винятком 1, трисомія за якою є летальною ще на доімплантаційній стадії [4,7,19,22].

На другому місці за частотою виявлення знаходяться триплоїдії (12, 4%), а також моносомія X (10, 5%) та тераплоїдії (9.2%). Серед триплоїдних зародків зустрічають варіанти 69, XYU; 69,XXX та 69,XXY [19]. При моносомії X 99% вагітностей перериваються на ранніх термінах через зупинку росту і лише 1% закінчується народженням дитини із синдромом Тернера [4]. Останнє місце за частотою займають структурні хромосомні аномалії (4, 7%), які включають як збалансовані, так і незбалансовані перебудови [19].

Таким чином, частоти різних хромосомних аномалій значно відрізняються серед абортусів та новонароджених. Серед новонароджених взагалі не зустрічається трисомій за 16 хромосомою, триплоїдів та тетраплоїдів, а найбільш поширеною є трисомія за 21 хромосомою (0,11%) та трисомії за статевими хромосомами (0,15%) [4].



Рис.1.3. Частоти хромосомних аномалій, пов'язаних з перериванням вагітності.

Отже, цитогенетичний аналіз абортного матеріалу є надзвичайно важливим для планування наступної вагітності, адже у ряді досліджень було доведено, що ризик повторного викидня є вищим у випадку якщо попередня вагітність була нормальною, ніж у разі хромосомно-аномальної втрати [4,23].

1.2. Дослідження абортного матеріалу при репродуктивних втратах

1.2.1. Ворсини хоріона як основний об'єкт дослідження. Оскільки переривання вагітності здебільшого відбувається на ранніх термінах, тобто в першому триместрі, особливо на 7-8 тижні вагітності, оптимальним об'єктом дослідження є ворсини хоріона [3,4,12,24,25].

Ворсини хоріона – це пальцеподібні виступи, що оточують ембріональний мішок на ранніх термінах вагітності та пізніше формують плаценту [24]. Процес формування хоріона починається з імплантації зародка в

ендометрій матки. До цього моменту запліднена яйцеклітина – зигота, після дроблення перетворюється в морулу, внутрішні клітини якої утворюють внутрішню клітинну масу або ембріобласт, а зовнішні – трофобласт. Після потрапляння в порожнину матки, морула поглинає певну кількість рідини і формується бластоциста, в якій шар трофобласту оточує внутрішню клітинну масу та рідину. На 6-7-й день після запліднення відбувається імплантація бластоцисти: контакт трофобласту й ендометрію запускає формування синцитіотрофобласту та цитотрофобласту – частин ворсинчастого хоріону [24–26].

Приблизно на 14-й день після запліднення цитотрофобласт починає вrostати в синцитіотрофобласт у вигляді пальцеподібних виростів, що мають назву первинних ворсин хоріона. Після цього в них врастає соматична мезодерма, утворюючи вторинні ворсини, а після формування мезенхімою кровоносних судин утворюються третинні ворсини хоріона [24–27].

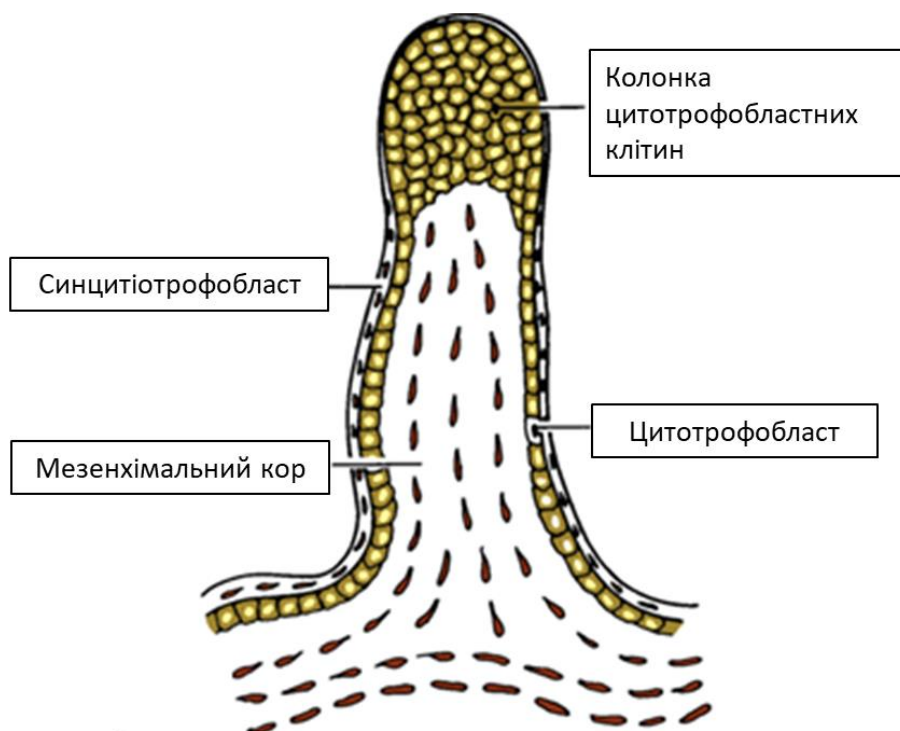


Рис.1.4. Будова ворсини хоріона. Адаптовано згідно з [32].

Таким чином, кожна ворсина складається з двох основних шарів: а) верхнього трофобластного шару; та б) мезенхімального кору (рис.1.4). При

цьому обидва шари є мітотично активними і підходять для лабораторних досліджень: як цитогенетичних, так і молекулярно-генетичних [25,28–31].

1.2.2. Прямий і непрямий методи дослідження ворсин хоріона: переваги та недоліки. Існує два основні методи цитогенетичного дослідження ворсин хоріона: прямий та непрямий. При використанні прямого методу ворсини хоріона витримують в гіпотонічному розчині з додаванням колхіцину для зупинки клітин на стадії метафази та руйнування клітинної оболонки, після чого їх інкубують із сумішшю метилового спирту й оцтовою кислотою для фіксації метафазних пластинок. Із отриманого матеріалу виготовляють препарати та проводять забарвлення [26].

Метод довгострокового культивування полягає у обробці ворсин трипсином з EDTA для усунення клітин трофобластного шару, інкубації з колагеназою для отримання суміші мезенхімальних клітин та їх культивування [28,29]. Після отримання культури, клітини теж інкубують із колхіцином, гіпотонічним розчином та фіксуючою сумішшю окремо. Із отриманого матеріалу виготовляють препарати та проводять забарвлення [26].

Основна відмінність між даними методами дослідження полягає у типі клітин, поділ яких використовується для аналізу хромосомного набору. У випадку прямого методу аналізується спонтанний поділ клітин цитотрофобласту, в той час як непрямий метод, або метод довгострокового культивування, дає змогу аналізувати поділ клітин мезенхімального кору ворсин хоріона [28,31].

Як зазначалося вище, ці клітини мають різне походження, а тому дають змогу аналізувати дві різні клітинні лінії. Клітини цитотрофобласту походять із трофобластного шару зародка, а клітини мезенхімального кору – від ембріобласту, тобто внутрішньої клітинної маси, яка дає початок ембріональним тканинам (рис.1.5) [25,28,29,31]. Таким чином, мезенхімальні клітини ворсин хоріона у більшому ступені відображають хромосомний набір плода [25,31,33–35].

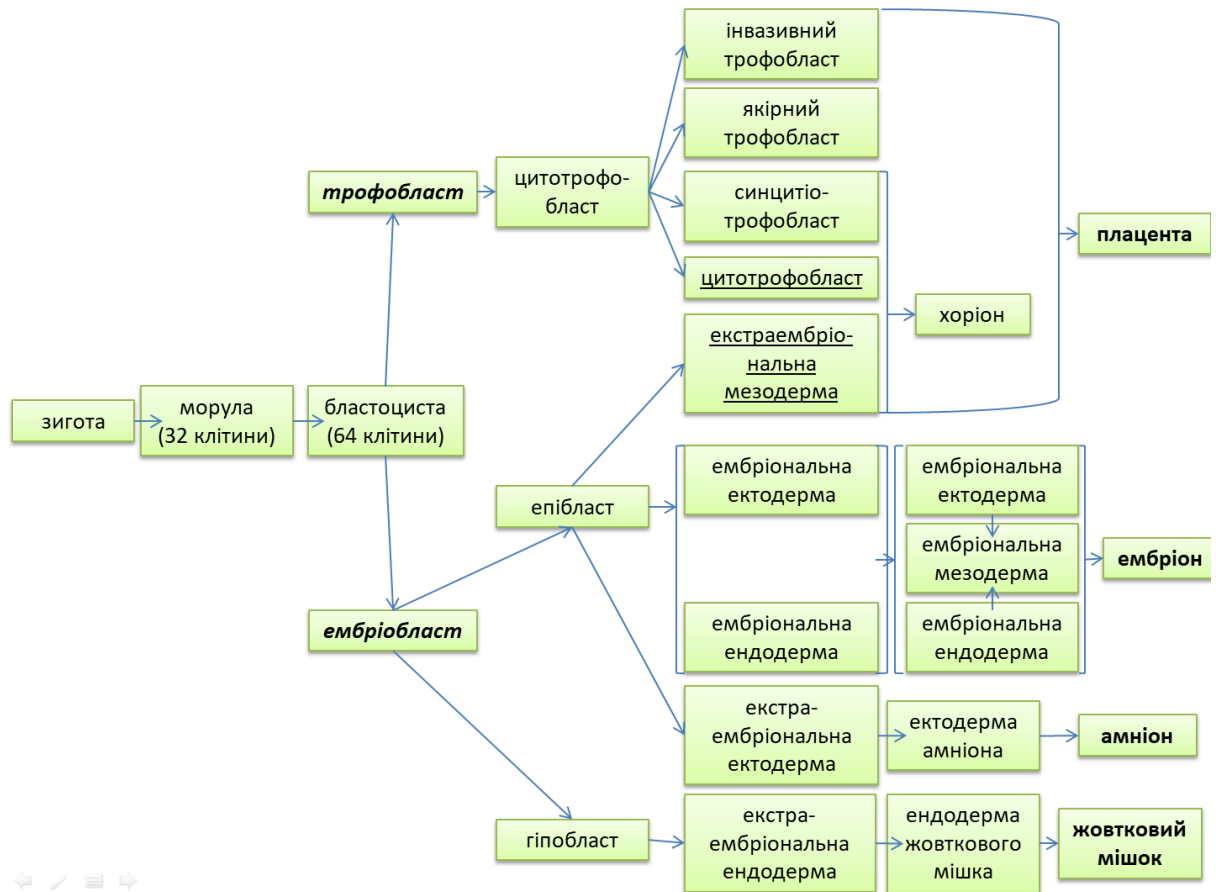


Рис.1.5. Схема походження клітин ворсин хоріона. Адаптовано згідно з [38].

Тож основним недоліком прямого методу дослідження ворсин хоріона є аналіз спонтанного поділу клітин цитотрофобласту, що неналежним чином відображає хромосомний набір хоріона. Це може призводити до отримання хибно-негативних або хибно-позитивних результатів аналізу, зважаючи на явище обмеженого плацентарного мозаїцизму [29,36]. Також сюди можна віднести погану якість отримуваних препаратів хромосом, порівняно із препаратами, отриманими після довгострокового культивування ворсин хоріона [37].

Проте явними перевагами прямого методу є швидкість проведення дослідження (24-48 год), низький рівень контамінації материнськими клітинами та низький рівень контамінації мікроорганізмами [28,29].

Найістотнішими перевагами непрямого методу є зниження вірогідності хибно-позитивних та хибно-негативних результатів, а також висока якість

препаратів метафазних хромосом, що значно полегшує проведення цитогенетичного аналізу [29,31]. В той же час цей метод є більш затратним із фінансової точки зору, оскільки використовуються дороговартісні поживні середовища із факторами росту, метод потребує більше часу (до 14 діб), підвищується ризик контамінації материнськими клітинами та мікроорганізмами, може бути відсутній ріст культури (у 10-40% випадків), а також зростає ймовірність виявлення артефактів культури [37,39]. Тому в клінічній практиці рекомендується застосування обох даних методів одночасно для аналізу одного зразка.

1.2.3. Принцип методу FISH для дослідження хромосомного набору хоріона. Метод флуоресцентної гібридизації *in situ* відноситься до групи молекулярно-генетичних методів дослідження і базується на здатності одноланцюгової молекули ДНК гібридизуватись із комплементарною їй. Цей метод застосовується для детекції та пошуку специфічної послідовності ДНК на метафазних хромосомах або в інтерфазних ядрах, при цьому таргетна ДНК є фіксованою на склі [40,41].

Першим кроком у дослідженні є підбір коротких одноланцюгових ДНК, які відповідають шуканій послідовності – ДНК-зондів, які мітяться різними способами. Існують дві основні стратегії мічення: а) пряме, за якого зонди мітяться за допомогою нуклеотидів, що містять флуорофор; та б) непряме, за якого модифіковані нуклеотиди містять гаптен, який в свою чергу несе мітку [42].

Існують три основні види ДНК-зондів: хромосомно-специфічні або центромерні (CEP - Chromosome Enumeration Probe), локус-специфічні (LSI - Locus Specific Identifiers) і зонди до теломерних ділянок (TEL-Telomeric Probe). Центромерні зонди призначені для ідентифікації центромерних регіонів хромосом та виявлення кількісних хромосомних аберацій. Вони містять відносно короткі нуклеотидні послідовності, що є комплементарними до багатьох хромосом-специфічних сателітних ДНК-повторів, локалізованих у центромерній ділянці певної хромосоми. Ген-специфічні зони гібридизуються

лише з унікальними послідовностями ДНК певної хромосоми. Теломерні зонди призначені для виявлення делецій і перебудов в кінцевих ділянках плечей хромосом. Такі зонди зазвичай є компелентарними до ділянок розміром близько 300 тисяч нуклеотидних пар від кінця хромосоми [43].

Після цього таргетну ДНК піддають денатурації, додають зонди і проводять гібридизацію, під час якої комплементарні ділянки зонду й аналізованої ДНК поєднуються [41,42].

У випадку прямого мічення візуалізувати сигнал можна одразу, а в разі застосування непрямого мічення необхідним є додатковий крок для візуалізації нефлюоресцентного гаптену, що використовує ферментативну або імунологічну систему детекції [42]. Візуалізують гібридизовані ДНК-мітки за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

Основними перевагами даного метода є: можливість його застосування на інтерфазних ядрах, тобто незалежність отриманих результатів від кількості клітин, які знаходяться в стадії метафази на момент фіксації на склі, на відміну від цитогенетичних методів; висока роздільна здатність, яка дозволяє встановлювати наявність мікроделецій, дуплікацій, транслокацій та ін., чого не можна зробити за допомогою цитогенетичних методів (найкраща роздільна здатність – 2000-3000 kb) та швидкість проведення аналізу (1-2 доби) [22,44].

Особливою важливою перевагою у роботі із абортним матеріалом є можливість аналізу інтерфазних ядер, адже у разі завмерлої вагітності плід довгий час може залишатись у порожнині матки, внаслідок чого тканини аутолізуються, втрачають мітотичну активність і в такому разі застосування цитогенетичних методів не дасть результатів.

В той же час метод FISH виявляє лише ті хромосомні аномалії, для яких наявні зонди та не виявляє структурні хромосомні перебудови [22].

1.3. Проблема мозаїцизму при дослідженні абортного матеріалу

1.3.1. Поняття обмеженого плацентарного мозаїцизму та його типи.

Одним із основних положень цитогенетики є уявлення про те, що каріотип всіх клітин одного індивіду є однаковим. Проте у зв'язку із існуванням явища мозаїцизму, тобто наявності у індивіда двох або більше клітинних ліній, що походять від однієї зиготи, це твердження не може вважатись абсолютно правильним [25].

Мозаїцизм може бути істинним або генералізованим, коли зачіпає всі тканини організму або ж бути обмеженим певним типом тканин [25,45]. Одним із таких типів мозаїцизму є обмежений плацентарний мозаїцизм, при якому клітини із аберантним каріотипом виявляються лише в провізорних тканинах зародка – хоріоні або плаценті, в той час як каріотип ембріону є нормальним [25,46–51]. Частота даної патології становить 1-2% [25,45,46,52–54].

В залежності від походження анеуплоїдії в позазародкових органах, ОПМ поділяють на мітотичний та мейотичний. Мітотичний ОПМ характеризується тим, що трисомна клітинна лінія утворюється внаслідок постзиготичної мітотичної дуплікації однієї хромосоми в плацентарній клітинній лінії (цитотрофобласті або екстраембріональній мезенхімі) під час дроблення нормальної диплоїдної зиготи. Мейотичний ОПМ виникає під час дроблення трисомної зиготи внаслідок втрати додаткової хромосоми і супроводжується формуванням клона диплоїдних клітин [55,56]. У 88% випадків хромосомний мозаїцизм виникає саме як результат корекції трисомії мейотичного походження [51]. При цьому в результаті такої корекції може з'являтися псевдонормальна клітинна лінія – тобто така, яка містить диплоїдні клітини, але з двома гомологічними хромосомами, отриманими від одного з батьків. Це явище називається уніпарентальною дисомією і може призводити до різних патологій пренатального розвитку [25].

У залежності від локалізації аномальних клітин в тканинах хоріона розрізняють три типи ОПМ (табл.1.1). Анеуплоїдна лінія може бути обмеженою клітинами цитотрофобласту (1 тип), клітинами мезенхімальної строми (2 тип) або знаходитись в обох клітинних лініях хоріона (3 тип) [26,50,55]. Найбільш частим вважається ОПМ 1 типу, а найрідкіснішим є ОПМ 3 типу [26]. При цьому тип 1 та 2 в основному мають мітотичне походження, в той час як тип 3 – мейотичне [56]. Порівняння частот ОПМ різних типів серед спонтанних абортусів та плодів з відносно нормальним внутрішньоутробним розвитком вказує на те, що мейотичні мутації в більшому ступені ніж мітотичні, відповідають за затримку ембріонального розвитку [25].

Таблиця 1.1

Типи ОПМ

Тканина	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Цитотрофобласт	Анеуплоїдія (мозаїчна/повна)	Нормальний каріотип	Анеуплоїдія (мозаїчна/повна)
Мезенхімальна строма	Нормальний каріотип	Анеуплоїдія (мозаїчна/повна)	Анеуплоїдія (мозаїчна/повна)
Тканини плода	Нормальний каріотип	Нормальний каріотип	Нормальний каріотип

Вважається, що хромосоми не випадково залучаються до різних типів ОПМ [56–58]. При мозаїцизмі 1 типу найчастіше спостерігаються трисомії за 3, 7, 13, 18, 20 та 21 хромосомою, в той час як трисомії за 8, 9 та 15 хромосомами є нечастими. Трисомії за іншими аутосомами взагалі не зустрічаються, а найбільш частою моносомією є моносомія X [53,56]. Мозаїцизм 2 типу рідко асоціюється із трисоміями за 5, 8, 9, 10, 12, 13, 21 та 22 хромосомами, найбільш характерними для даного типу є трисомії за 2,7 та 18 хромосомами. Для мозаїцизму 3 типу найбільш частими випадками є трисомії за 15, 16, 18 хромосомою, рідко – 7, 13, 20 та 22 хромосома, інші взагалі не

зустрічаються (рис.1.6) [56]. За іншими даними, при ОПМ 3 типу найчастіше спостерігаються трисомії за 7, 9, 16 та 22 хромосомами [55].

Тип мозаїцизму	Хромосома																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
1			■				■	■	■				■		■			■		■	■			М
2		■			■		■	■	■			■	■					■			■	■		
3							■						■		■	■		■		■				

Примітки. Частота виявлених пренатально випадків трисомії: ■ $\geq 10\%$;
 ■ 3–10%; □ не виявлено
 М — моносомія

Рис.1.6. Залученість різних хромосом у формування ОПМ 1,2 та 3 типів. Адаптовано згідно з [56].

Окрім механізму й стадії виникнення мутації (порушення мітозу чи мейозу) на тканиноспецифічний розподіл аномальної клітинної лінії в провізорних органах може впливати і зміна проліферативної активності [59], міграції й компартменталізації аномальних клітин. Так було показано, що існує зміна експресії антигенів клітинної проліферації PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) і Ki67 у культурах клітин з трисоміями 2,15, 16 і 22, що пов'язані із ранньою ембріональною летальністю. В той же час в культурах клітин із трисоміями 13, 18 і 21 зменшення експресії не спотерігалось, що корелює із довшим пренатальним розвитком і живонародженням плодів з даними анеуплоїдіями. Крім того, висока мітотична активність клітин трофобласта, порівняно із екстраембріональною мезодермою, може бути пов'язана із підвищеною частотою виникнення мутацій саме в трофобласті [25].

1.3.2. Діагностика ОПМ та його вплив на внутрішньоматковий розвиток плода. Для встановлення точного діагнозу ОПМ необхідним є цитогенетичне дослідження усіх трьох ембріональних клітинних ліній: трофоектодерми, екстраембріональної мезенхіми та власне ембріона [56]. Лінія трофоектодерми представлена клітинами цитотрофобласта, спонтанний поділ яких аналізується при проведенні прямого методу каріотипування ворсин хоріона. Клітини екстраембріональної мезенхіми – мезенхімальні стовбурові

клітини кору ворсин хоріона аналізуються шляхом довгострокового культивування, а клітини власне ембріона можна каріотипувати після процедури амніоцентезу (фібробласти плода) або кордоцентезу (лімфоцити периферійної крові).

Таким чином, при виявленні хромосомних аберацій під час застосування прямого методу аналізу ворсин хоріона або методу довгострокового культивування, якщо вагітність не перервана, рекомендованими є інструментальні дослідження для встановлення каріотипу плода і спростування діагнозу ОПМ або ж підтвердження і встановлення типу мозаїцизму, оскільки це є важливим для прогнозування перебігу вагітності [55].

Показано, що 16-21% вагітностей із ОПМ супроводжується різними ускладненнями – від внутрішньоутробної загибелі плода до затримки внутрішньоутробного розвитку плода, або ж народження плода з вагою, що перевищує нормальну [47,52].

ОПМ має різне клінічне значення для перебігу вагітності, залежно від локалізації анеуплоїдних клітинних ліній в тканині плаценти, тобто типу мозаїцизму, та залучених хромосом [38,56]. Було показано, що ОПМ 2 типу не впливає на внутрішньоутробний розвиток плода, в той час як ОПМ 3 типу пов'язаний із передчасними пологамі, неонатальною гіпотрофією, SGA новонародженими та серйозними ускладненнями вагітності, що підтверджує думку про те, що мейотичний мозаїцизм в більшій мірі асоційований із затримкою внутрішньоутробного розвитку плода, оскільки в такому випадку розвиток починається із трисомної зиготи із значними порушеннями програм онтогенезу [60].

Ймовірно, це можна також пояснити числом клітин, залучених до мозаїцизму – у випадку мозаїцизму 2 типу аномальними будуть лише клітини мезенхімальної стромі, в той час як при мозаїцизмі 3 типу – як клітини стромі, так і клітини цитотрофобласту, що в більшій мірі впливає на функції хоріону як провізорного органу. При дослідженні плаценти після пологів у вагітних із діагностованим ОПМ, внутрішньоутробна затримка росту спостерігалась в

35% випадків при високих рівнях анеуплоїдних клітин в тканині, в той час як низькі рівні корелювали із нормальним розвитком [56]. Більшість випадків ОПМ 1, так само як і 2 типу, є результатом порушень мітозу, тому можна припустити, що його ефекти також не матимуть істотного впливу на ембріональний розвиток [38,55]. Проте існують і дані про те, що цей тип мозаїцизму у 22% випадків призводить до невиношування вагітності, затримки внутрішньоутробного розвитку, внутрішньоматкової загибелі плода або перинатальної смертності [56].

Також варто брати до уваги феномен уніпарентальної дисомії, про яку вже йшлося раніше [36,38]. Така патологія може зумовлювати різницю в перебігу вагітності та внутрішньоутробному розвитку плода у випадках трисомій за однією хромосомою, оскільки обидва батьківські геноми є необхідними для нормального розвитку плода. Вважається, що гени батька необхідні для розвитку трофобластних тканин, а материнські – особливо важливі для раннього ембріонального розвитку. Тому материнська або батьківська ізодисомія може призводити до аномального розвитку плода, розумової відсталості тощо [52].

Отже, необхідно визначати каріотип усіх ембріональних клітинних ліній, оскільки хромосомні аберації в кожній з них можуть призводити до абсолютно різних наслідків – від внутрішньоматкової загибелі плода до нормального перебігу вагітності й народження здорової дитини.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема експерименту та об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження виступав абортний матеріал, отриманий в результаті заведеної вагітності у жінок. Забір матеріалу здійснювався лікарем у медичному закладі, після чого його доставляли до лабораторії цитогенетики ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія». Дані про отриманий біологічний матеріал заносили до журналу реєстрації прийому біологічного матеріалу.



Рис.2.1. Схема експерименту.

Матеріал аналізували непрямим методом (методом довгострокового культивування): ворсини хоріона очищували від зайвого матеріалу, обробляли й виконували посадку клітин, далі клітини культивували, виконували гіпотонічну обробку, фіксували, виготовляли препарати метафаз хромосом, виконували забарвлення препаратів G-методом та проводили аналіз отриманих препаратів, а також прямим методом: очищені ворсини хоріона того ж пацієнта піддавали гіпотонічній обробці та фіксували одразу безпосередньо після отримання, виготовляли препарати метафаз хромосом, виконували фарбування препаратів G-методом та проводили аналіз отриманих препаратів. Визначали частоти хромосомних аномалій серед зразків, що аналізувались різними методами, а також порівнювали дані для виявлення явища обмеженого плацентарного мозаїцизму (рис.2.1).

2.2. Витратні матеріали, реактиви та обладнання необхідні для дослідження

При проведенні досліджень використовували такі витратні матеріали:

- ємності для дезінфекції;
- дезінфікуючий розчин;
- спиртові серветки;
- марлеві серветки;
- паперові серветки;
- предметні скельця;
- шприци стерильні об'ємом 4, 6, 10, 20 мл;
- нестерильні пастерівські піпетки;
- алмазний олівець;
- парафільм;
- пробірки;
- нестерильні рукавички з тальком та без;
- стерильні рукавички;
- бідистильовану воду;

- мийний засіб для обробки предметних скелець;
- білі й жовті накінецьники для автоматичної піпетки.

Реактиви:

- цитрат натрію;
- хлорид калію;
- середовище RPMI-1640 (Sigma, USA) ;
- культуральне середовище AmnioMax II (Gibco, USA) ;
- середовище MEM (Gibco, USA) ;
- колагеназа (Sigma, USA) 125 U/ml;
- буфер Дюльбекка (Sigma, USA);
- колхіцин;
- метиловий спирт;
- крижана оцтова кислота;
- 0,25% розчин трипсину/EDTA (Gibco, USA);
- фосфатний буфер (pH 6,8) (Gibco, USA);
- барвник Гімзе (Sigma, USA);
- імерсійне масло без флуоресценції;
- розчин спиртовий 96% «Септол»;
- розчин спиртовий 85%;
- розчин спиртовий 70% «Септил»;
- KCl 0,075M;
- цитрат натрію 1% та 0,9%;
- 20×SSC;
- NP-40;
- пепсин;
- формальдегід;
- DAPI II;
- флуоресцентні проби для хромосом 13, 18, 21, X, Y, 13/21, 14/22, 15, 16 (Cytocell Aquarius, UK).

Обладнання:

- ламінарний бокс;
- інкубатор (5% CO₂);
- термостат;
- ваги електронні;
- термостат водяний;
- центрифуга-міксер;
- витяжна шафа;
- морозильна камера;
- холодильник;
- вортекс;
- дозатор для серологічних піпеток;
- центрифуга;
- спиртова горілка;
- піпетка автоматична;
- світловий мікроскоп;
- інвертований мікроскоп;
- флуоресцентний мікроскоп;
- гібридизатор;
- рН-метр.

Лабораторний посуд:

- стерильні чашки Петрі (діаметром 60 та 35 мм);
- центрифужні пробірки з кришками;
- штативи для центрифужних пробірок;
- стерильні пінцети;
- стерильні скальпелі;
- скляні банки з кришками;
- скляні мірні стакани;
- мірні циліндри;

- стерильні пастерівські піпетки;
- склянки для розчинів;
- серологічні піпетки (10 мл);
- стерильні флакони Т-25 із синьою кришкою з фільтром (Nunc, Данія).

2.3. Підготовка розчинів

По ходу дослідження готували наступні розчини:

1. Маточний розчин колагенази (1000 U/ml): 100 мг порошку ліофілізованого ферменту розчиняємо в 12,5 мл буфера Дюльбекка, фільтруємо та розливаємо в еппендорфи по 1 мл для зберігання у морозильній камері. Термін зберігання розчину при температурі -20°C становить 5 місяців.
2. Робочий розчин колагенази (100 U/ml): 1 мл маточного розчину кімнатної температури розводимо 9 мл середовища MEM. Зберігаємо в холодильнику, термін зберігання до 2-х місяців.
3. Розчин 0,075 М KCl: розчиняємо 280 мг KCl у 50 мл нагрітої до температури $+37^{\circ}\text{C}$ дистильованої води. Приготування розчину виконують в день проведення дослідження, оскільки він зберігається протягом однієї доби, перед застосуванням має бути нагрітим до $+37^{\circ}\text{C}$.
4. Розчин цитрату натрію 1,0%: розчиняємо 100 мг цитрату натрію у 10 мл нагрітої до температури $+37^{\circ}\text{C}$ дистильованої води. Готують перед проведенням дослідження, термін зберігання даного розчину становить одну добу, перед застосуванням має бути нагрітим до $+37^{\circ}\text{C}$.
5. Розчин цитрату натрію 0,9%: розчиняємо 180 мг цитрату натрію у 20 мл нагрітої до температури $+37^{\circ}\text{C}$ дистильованої води. Готують перед проведенням дослідження, зберігають одну добу, перед застосуванням має бути нагрітим до $+37^{\circ}\text{C}$.

6. Розчин для гіпотонії: нагрітий до $+37^{\circ}\text{C}$ розчин 0,075 М KCl і 1% розчин цитрату натрію змішуємо у співвідношенні 3:1 безпосередньо перед додаванням гіпотонії до суспензії клітин.

7. Фіксуюча суміш: змішуємо крижану оцтову кислоту із метиловим спиртом у співвідношенні 1:3. Розчин готують безпосередньо перед фіксацією під витяжною шафою. Перед застосуванням він має бути охолодженим до -18°C протягом 30 хв.

8. 0,1%-ий розчин колхіцину: 10 г колхіцину розчиняємо у 100 мл дистильованої води. Зберігаємо при температурі $+4^{\circ}\text{C}$.

9. 0,01%-ий розчин колхіцину: розчин колхіцину розводимо дистильованою водою у співвідношенні 1:9. Зберігати при температурі $+4^{\circ}\text{C}$.

10. 60%-ий розчин оцтової кислоти: до 6 мл 99% оцтової кислоти додаємо 4 мл дистильованої води. Готуємо безпосередньо перед використанням.

11. Робочий розчин барвника Гімзе: до 25 мл фосфатного буфера (pH 6,8) додаємо 0,75 мл барвника Гімзе. Розчин можна використовувати протягом одного робочого дня.

12. 20×SSC: до 66 г 20×SSC додаємо дистильовану воду до 250 мл. Зберігаємо при кімнатній температурі протягом 6 місяців.

13. 2×SSC: до 4 мл 20×SSC додаємо 36 мл дистильованої води. За необхідності доводимо pH до 7,0 за допомогою NaOH або HCl. Готуємо безпосередньо перед аналізом.

14. Розчин для денатурації 0,95М формальдегід: до 1,0 мл формальдегіду та 0,18 г MgCl_2 додаємо 39 мл PBS.

15. 0,3% NP-40 у 0,4×SSC: у 95 мл дистильованої води розчиняємо 2 мл 20×SSC та додаємо 0,3 мл NP-40. За необхідності доводимо pH до 7,0 за допомогою NaOH або HCl. Додаємо дистильовану воду до 100 мл. Зберігаємо при кімнатній температурі протягом 6 місяців.

16. 0,1% NP-40 у 2×SSC: у 84,9 мл дистильованої води розчиняємо 10 мл 20×SSC та 0,1 мл NP-40. За необхідності доводимо pH до 7,0 за

допомогою NaOH або HCl. Додаємо дистильовану воду до 100 мл. Зберігаємо при кімнатній температурі протягом 6 місяців.

17. 10% розчин пепсину: 10 мг пепсину розчиняємо у 100 мкл дистильованої води і розфасовуємо по 20 мкл в пробірки типу Еппендорф. Зберігаємо за температури -18°C .

18. Робочий розчин пепсину: розчиняємо 2 мг пепсину (20 мкл 10% пепсину) у 40 мл 0,01M HCl. Готуємо безпосередньо перед аналізом.

2.4. Методи дослідження

2.4.1. Метод довгострокового культивування клітин ворсин хоріона (непрямий метод).

2.4.1.1. Підготовка суспензії мезенхімальних клітин ворсин хоріона, посадка та культивування. Після забору абортного матеріалу лікарем він має бути доставлений до клініко-діагностичної лабораторії та оброблений протягом 24 год. При цьому зразок має зберігатись за кімнатної температури, не допускається його охолодження або нагрівання.

Після отримання зразка лабораторією та занесення даних про отриманий біологічний матеріал до журналу реєстрації прийому біологічного матеріалу приступали до його обробки. Всі розчини, необхідні для виконання методу мають бути підігрітими до температури $+37^{\circ}\text{C}$.

Зразки ворсин хоріона обережно переносили із контейнера для транспортування в 60-мм чашку Петрі. Очищували близько 20-25 мг матеріалу, прибираючи слиз, децидуальну оболонку та кров'яні згустки стерильним пінцетом. Отримані шматочки поміщали в 35-мм чашки Петрі із 2 мл культурального середовища AmnioMax та промивали.

Стерильним пінцетом переносили чисті ворсинки в чашку Петрі з 2 мл свіжого розчину трипсину/ЕДТА, промивали протягом 30 сек і переносили до наступної чашки Петрі із 2 мл свіжого розчину трипсин/ЕДТА. Накривали чашку Петрі кришкою та поміщали в інкубатор на 15 хв.

По завершенню експозиції оцінювали відшарування шару трофобластних клітин від ворсин під інвертованим мікроскопом (рис.2.2). В разі якщо клітини не дисоціювали – розтирали розчин трипсин/ЕДТА із ворсинами стерильною пастерівською піпеткою та повторно інкубували 15 хв. Стан дисоціації клітин оцінювали кожні 15 хв до готовності.

Після того як клітини трофобластного шару дисоціювали, чашку Петрі із зразком поміщали в ламінарний бокс, всі наступні кроки проводили в боксі. Використовуючи стерильну пастерівську піпетку розтирали трипсин/ЕДТА із ворсинами 4-5 разів, аби розділити ворсини й клітини трофобласта. Ворсини мають стати довгі й волокнисті, тягучі та липкі.

Далі пінцетом переносили ворсини в 35-мм чашку Петрі із 2мл середовища MEM на 10-15 сек, аби відмити залишковий трипсин. Після цього переносили ворсини в пусту 35-мм чашку Петрі та обережно різали скальпелем. Необхідно різати обережно, оскільки шматочки пластику можуть відколотись й в подальшому інгібувати клітинний ріст.

Після того як ворсини були подрібнені (мають бути відсутні великі шматочки) додавали 2 мл робочого розчину колагенази до чашки Петрі та обертали ворсини в розчині. Поміщали в інкубатор на 15-30 хв. Далі перевіряли стан клітин під інвертованим мікроскопом (рис.2.2). Якщо утворилась суспензія із поодиноких клітин – переходили до наступних кроків, якщо ні – повертали зразок в інкубатор та оцінювали кожні 15 хв.

Поміщали зразок в ламінарний бокс і пастерівською піпеткою розтирали вміст чашки. Додавали 2 мл культурального середовища AmnioMax та переносили вміст у 15-мл центрифужну пробірку. Промивали чашку Петрі 2 мл культурального середовища AmnioMax та переносили в ту ж пробірку. Центрифугували при 900 об/хв. 10 хв за кімнатної температури.

Обережно видаляли супернатант, не чіпаючи осад. Ресуспендували осад в 2 мл культурального середовища AmnioMax та переносили отриману суспензію в Т-25 флакон із синьою кришкою з фільтром та інкубували до прикріплення

клітин (80-90% конфлуентності). Середовище необхідно змінювати кожні 3-4 доби.

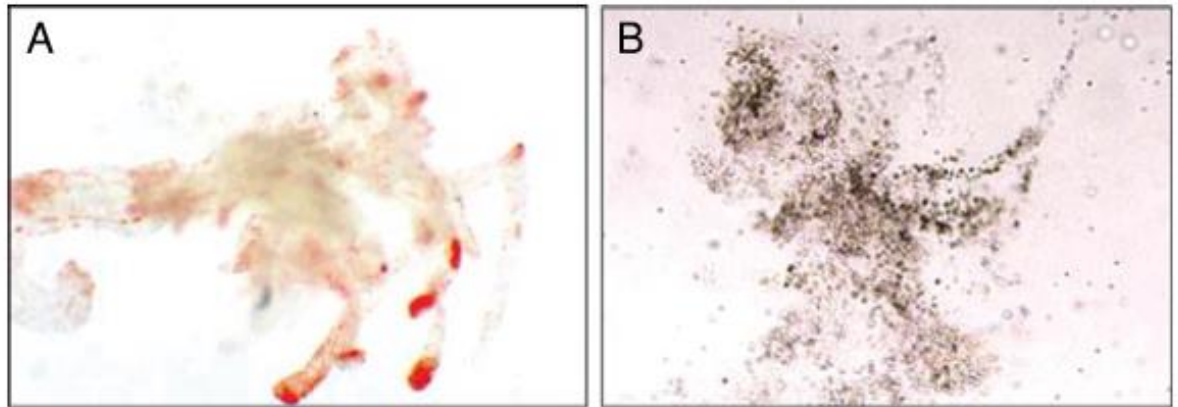


Рис.2.2.Дисоціація ворсин хоріона: А) дисоціація трофобластного шару після інкубації ворсин хоріона у розчині трипсину/ЕДТА; В) утворення суспензії мезенхімальних клітин після інкубації ворсин хоріона у колагеназі [29].

Через 2-3 доби культивування перевіряли прикріпленість та ріст клітин у флаконах та замінювали середовище на свіже. Для цього стерильною пастерівською піпеткою відбирали старе середовище із флакона та вносили 2 мл свіжого підігрітого до $+37^{\circ}\text{C}$ середовища AmnioMax. Культивували ще 2-3 доби.

Використані матеріали, відпрацьовані середовища, рукавички та залишок біологічного матеріалу поміщали у ємність для знезараження.

2.4.1.2. Фіксація культури мезенхімальних клітин ворсин хоріона. За умови наявності достатньої кількості колоній та клітин із видимими ядрами проводили фіксацію культури мезенхімальних клітин ворсин хоріона.

За 1 год до фіксації підігрівали до $+37^{\circ}\text{C}$ розчин Дюльбекка, середовище RPMI-1640, 0,25% розчин трипсину/ЕДТА, 0,075 М хлорид калію і 1% цитрат натрію, а також готували предметні скельця. Для цього їх знежирювали мийним засобом, промивали спочатку водогінною, а потім тричі дистильованою водою та охолоджували у мірному стакані із дистильованою водою в морозильній камері (-20°C) до формування на поверхні води кірочки льоду.

У флакон із зразком додавали 10 мкл колхіцину (10 мкг/мл) та витримували протягом 20 хв в інкубаторі.

Після цього піпеткою відбирали середовище та переносили у стерильну пробірку для центрифугування. Промивали флакон 2 мл середовища Дюльбекка. Піпеткою відбирали середовище та переносили у ту ж саму пробірку. У флакон додавали 2 мл 0,25% розчину трипсину/ЕДТА та інкубували протягом 12 хв у CO₂-інкубаторі разом із пробіркою. Перевіряли під інвертованим мікроскопом відкріпленість клітин, якщо відкріпились – струшували флакон, відбирали піпеткою розчин трипсину та переносили у пробірку для центрифугування з відібраним раніше середовищем. Промивали флакон середовищем RPMI-1640 та переносили у центрифужну пробірку. Центрифугували при 1,5 тис об/хв протягом 6 хв.

Відбирали надосадову рідину до 0,5 мл, обережно перемішували осад та по краплинах додавали 8 мл гіпотонічного розчину. Витримували 20 хв в термостаті при температурі +37°C після чого по краплинах додавали 1 мл фіксуючого розчину та центрифугували при 1,5 тис об/хв протягом 8 хв.

Відбирали надосадову рідину до 0,5 мл, обережно перемішували осад та по краплинах додавали 5 мл фіксуючої суміші, постійно струшуючи пробірку. Залишали на 20 хвилин при температурі +4°C, після чого центрифугували при 1,5 тис об/хв протягом 8 хв. Відбирали надосадову рідину до 0,5 мл, додавали 5 мл фіксуючої суміші та центрифугували при 1,5 тис об/хв протягом 8 хв, повторювали останні три кроки двічі. Залишали пробірки при +4°C щонайменше на добу.

2.4.1.3. Виготовлення препаратів. Пробірки зі зразками центрифугували при 1,5 тис об/хв протягом 8 хв. Відбирали надосадову рідину до 0,5 мл та перемішували осад шляхом піпетування. Пастерівською піпеткою капали 3-8 краплин суспензії клітин по всій довжині скла, тримаючи його на випростаній руці. Підсушували препарат у полум'ї спиртівки. На кожного пацієнта виготовляли по 3 препарати.

Витримували препарати за кімнатної температури протягом 3-5 днів.

2.4.2. Прямий метод дослідження ворсин хоріона.

2.4.2.1. Фіксація трофобластних клітин ворсин хоріона. Після забору абортного матеріалу лікарем він має бути доставлений до клініко-діагностичної лабораторії та оброблений безпосередньо після отримання.

Після отримання зразка лабораторією заносили дані про отриманий біологічний матеріал до журналу реєстрації прийому біологічного матеріалу та приступали до його обробки.

На кожного пацієнта готували 4 пробірки, попередньо нагріті до 37°C. У 2 пробірки вносили по 2 мл 1,0 % розчину цитрату натрію, у інші 2 пробірки – по 4 мл 0,9 % розчину цитрату натрію. На кожній пробірці зазначали прізвище пацієнта, вказували тип матеріалу (абортний матеріал або біоптат хоріона) і дату посадки матеріалу. Якщо матеріалу було недостатньо для чотирьох пробірок, готували одну пробірку з 2 мл 1,0 % розчину цитрату натрію і 2 пробірки з 4 мл 0,9 % розчину цитрату натрію.

За допомогою чистих сухих пінцетів поміщали ворсинчастий хоріон із ємності, в якій його транспортували, у чашку Петрі 60 мм, наповнену фізіологічним розчином із додаванням гепарину. Очищували від зайвих тканин та кров'яних згустків, та подрібнювали аби отримати окремі ворсини хоріона. Пінцетом переносили окремі ворсини у заздалегідь приготовані пробірки з розчинами цитрату натрію, після чого додавали по 2 краплини 0.1% розчину колхіцину у пробірки з 1,0 % цитратом натрію та по 3 краплини у пробірки з 0,9 % цитратом натрію та обережно перемішували. Рукавички, чашки Петрі із залишками біологічного матеріалу переносили у ємності для знезараження.

Пробірки поміщали в термостат (37°C) на 40 хв, якщо термін вагітності становить менше 13 тижнів, або на 45 хв, якщо термін вагітності більше 13 тижнів. Якщо термін вагітності більше 18 тижнів, то на кожний тиждень вагітності додавали по 2 хв гіпотонії, але в загальному час має становити не більше 50-ти хв. В цей час готували фіксуючу суміш, яка має протягом 20 хв охолотитись за температури -20°C у морозильній камері.

Після інкубування з колхіцином із пробірок з 4 мл 0,9 % цитрату натрію відбирали 2 мл розчину і зливали. По краплинам додавали 2-3 мл фіксуючої суміші і залишали при кімнатній температурі на 50 хв.

В цей час працювали з пробірками з 2 мл 1,0 % цитрату натрію. Після інкубування їх із колхіцином, із пробірок відбирали весь розчин гіпотонії і зливали. Вносили 1-2 мл фіксуючої суміші по краплині і одразу зливали її. Вносили 3-4 мл фіксуючої суміші та залишали на 30 сек. Замінювали на свіжу фіксуючу суміш і поміщали у морозильну камеру (-20°C) щонайменше на 2 год.

Після проходження 50 хв повертались до роботи із зразками в пробірках з 4 мл 0,9 % цитрату натрію. Зливали повністю суміш фіксатора й гіпотонії і вносили 3-4 мл свіжої суміші. Через 30 сек знову замінювали на свіжу фіксуючу суміш і поміщали у морозильну камеру (-20°C) щонайменше на 2 год.

2.4.2.2. Виготовлення препаратів. На кожную пробірку готували по 2 предметних скельця. Для цього їх знежирювали мийним засобом, промивали спочатку водогінною, а потім тричі дистильованою водою, охолоджували в морозильній камері (-20°C) протягом 5 хв та висушували на повітрі за кімнатної температури.

Діставали з пробірки ворсинки хоріона чи плаценти за допомогою чистого сухого пінцета та знімали з них надлишок фіксатора фільтрувальним папером. Попередньо підготовлене предметне скельце підігрівали над полум'ям спиртової горілки і наносили на нього краплину 60% оцтової кислоти. Поміщали у цю краплину ворсини хоріона та підігрівали 20-40 сек над спиртовою горілкою. Після цього ворсинки переносили на інше скельце у свіжу краплину 60% оцтової кислоти, а суспензію клітин після мацерації перемішували і розкатували по усьому скельцю неперервною доріжкою від одного краю предметного скельця до іншого (рис.2.3). Препарат змивали фіксуючою сумішшю, залишки фіксатора знімали серветкою, препарат підсушували над полум'ям горілки і залишали до повного висихання при кімнатній температурі. Препарат на другому скельці готували аналогічно.

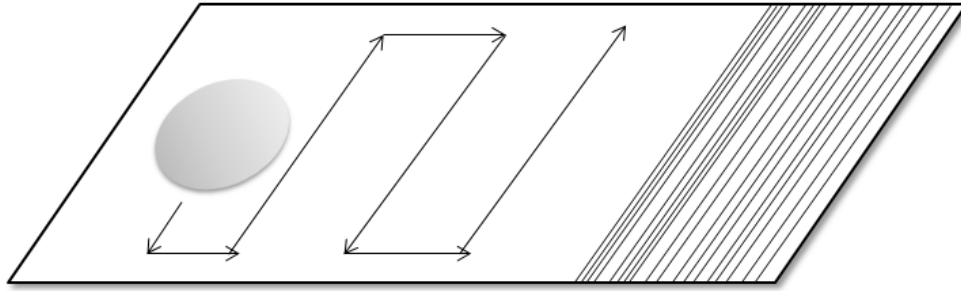


Рис.2.3. Схема розподілення суспензії клітин ворсин хоріона по поверхні предметного скельця.

Отримані препарати витримували при температурі 37°C протягом 5 днів, після чого виконували їх забарвлення.

2.4.3.Забарвлення препаратів G-методом та їх аналіз. G-метод диференційного забарвлення полягає в обробці хромосом протеолітичним ферментом трипсином та наступному фарбуванні барвником Гімзе, внаслідок чого формується характерна поперечна посмугованість хромосом. При цьому ділянки гетерохроматину, які багаті на АТ пари, транскрипційно неактивні та пізно реплікуються, зафарбовуються сильніше і виглядають як темні смуги, в той час як менш конденсовані ділянки – еухроматинові – які багаті на GC пари, є транскрипційно активними та рано реплікуються – зафарбовуються слабше і дають світлі смуги (рис.2.4) [61].

Для забарвлення препаратів G-методом препарат занурювали у 0,25 % розчин трипсину на 1-30 сек (залежно від терміну витримки препаратів), струшували препарат для видалення залишків розчину трипсину. Після цього на препарат одразу наносили робочий розчин барвника Гімзе на 3-7 хв. Час обробки трипсином та барвником для кожної серії препаратів підбирали окремо. Після цього змивали водогінною водою, а потім дистильованою та висушували на повітрі.

Аналіз препаратів здійснювали під світловим мікроскопом із використанням імерсійного об'єктива (збільшення $\times 100$). Запис каріотипу виконували згідно з «Міжнародною системою для номенклатури в

цитогенетиці людини» («An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN-2016»). Отримані результати реєстрували у журналі реєстрації пренатальних цитогенетичних досліджень та заносили до таблиці для порівняння даних, отриманих за допомогою прямого і непрямого методу дослідження ворсин хоріона.



Рис.2.4.Забарвлення препаратів хромосом G-методом. Характерна поперечна посмугованість хромосом [10].

2.4.4. Метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). Готували препарати клітин ворсин хоріона згідно з пунктом 2.4.2.2. Відмічали на препаратах алмазним олівцем зони гібридизації. Поміщали предметні скельця у розчин 2×SSC на 60 хв за температури 37°C. Для покращення проникнення ДНК-зондів в ядра клітин проводили інкубацію препаратів у розчині пепсину. Для цього переносили скельця у свіжий робочий розчин пепсину, попередньо підігрітий до 37°C. Після цього переносили скельця у розчин буфера Дюльбекка на 5 хв.

Для денатурації ДНК інтерфазних ядер клітин занурювали предметні скельця у розчин для денатурації (0,95% формальдегід) на 5 хв за кімнатної температури. Переносили скельця у розчин буфера Дюльбекка на 5 хв. Після цього, використовуючи пінцет, занурювали скельця послідовно у 70% розчин етанолу та інкубували 1 хв, далі в 85% розчин етанолу та інкубували 1 хв та у спиртовий розчин 96% «Септол» на 1 хв. Препарати висушували на повітрі.

Подальші етапи гібридизації з ДНК-зондами проводили у темній кімнаті. Розморозували зонди за кімнатної температури. Перемішували на центрифугі-міксері, центрифугували на мікроцентрифугі. Повторно перемішували за допомогою центрифуги-міксера та центрифугували на мікроцентрифугі. Розводили зонди у буфері відповідно до протоколу виробника.

Наносили 2,5 мл зонду на попередньо відмічену зону гібридизації та накривали покривним скельцем 13 мм. Зверху покривне скельце накривали парафільмом та поміщали препарат у вологу попередньо нагріту до $+37^{\circ}\text{C}$ гібридизаційну камеру на 5 хв. Закривали кришку гібридизатора та вмикали відповідну програму для гібридизації, відповідно до зазначених у паспорті вимог виробника зондів.

Для пост-гібридизаційного відмивання наливали розчин 0,3% NP-40/0,4×SSC у склянку та нагрівали на водяній бані за температури не вищої ніж 73°C . У іншу склянку наливали розчин 0,1% NP-40/2×SSC та залишали за кімнатної температури.

Діставали скельця із гібридизатора, знімали парафільм, обережно знімали покривне скельце та негайно переносили препарат у розчин 0,3% NP-40/0,4×SSC. Струшували 1 секунду та інкубували протягом 2 хв. Після цього промивали препарати у 0,1% NP-40/2×SSC протягом 1 хв, промивали дистильованою водою та висушували в темноті. Додавали 3,5 мкл DAPI II на кожну зону гібридизації та накривали покривним скельцем.

Аналіз гібридизаційних сигналів проводили у темній кімнаті під флуоресцентним мікроскопом. Оцінювали якість приготованих препаратів: щільність клітин, флуоресцентний фон, перехресну гібридизацію, інтенсивність

сигналу. Якщо виготовлений препарат не відповідав нормі за цими критеріями – виготовляли новий препарат та проводили повторну гібридизацію.

Аналіз сигналів хромосом проводили із використанням об'єктиву $\times 100$, задокументовували кількість інтерфазних ядер із сигналами, користуючись такими правилами: а) два сигнали приблизно однакового розміру, що знаходяться поруч, але не сполучені між собою враховували як два сигнали; б) два маленькі сигнали, сполучені між собою, враховували як один сигнал; в) дифузний сигнал враховували як один сигнал, якщо дифузність неперервна та не виходить за можливі межі розміру сигналу; г) не враховували ядра з нечіткими сигналами.

Результат аналізу фіксували у журналі реєстрації молекулярно-генетичних досліджень, вказуючи які проби було використано для аналізу. Запис результату досліджень здійснювали згідно з «Міжнародною системою для номенклатури в цитогенетиці людини» («An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN-2016») та заносили до таблиці для порівняння з даними, отриманими за допомогою непрямого методу дослідження ворсин хоріона.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Удосконалення методики довгострокового культивування ворсин хоріона

3.1.1. Зміни початкового протоколу для збільшення продуктивності методу. В ході проведення експерименту для отримання кращих результатів та зменшення рівня контамінації серед зразків у первинний протокол вносили певні зміни.

По-перше, було скорочено час витримки ворсин хоріона у розчині трипсину-ЕДТА та розчині колагенази, оскільки використовувалися завжди свіжі розчини, і дезагрегація клітин трофобласту та утворення суспензії мезенхімальних клітин спостерігалась значно раніше – через 15 хв. замість 30 хв.

По-друге, зважаючи на хороший ріст культури, заміну поживного середовища виконували одноразово, коли клітини починали формувати колонії і через день після заміни проводили фіксацію клітин, аби вони знаходилися в потрібній фазі мітозу і можна було отримати якісний препарат метафаз хромосом. Проте, в результаті, кількість метафазних пластин була незадовільною, тому час культивування мезенхімальних клітин подовжили, культивували до моменту покривання колоніями мезенхімальних клітин приблизно 70% дна флакону (приблизно 3-5 день культивування, рис.3.1), далі проводили заміну поживного середовища і через день фіксували. Кількість отриманих метафазних пластин на склі зроста.

По-третє, у процесі фіксації клітин, початково розчинення осаду після центрифугування у розчині досягали за допомогою змішування на вортексі, проте в подальшому цей етап замінили на легке струшування рукою для запобігання руйнуванню метафазних пластинок, в результаті їх якість значно зроста і, відповідно, час проведення власне каріотипування значно зменшився,

оскільки менша кількість отриманих препаратів необхідна була для аналізу потрібної кількості метафазних пластин.

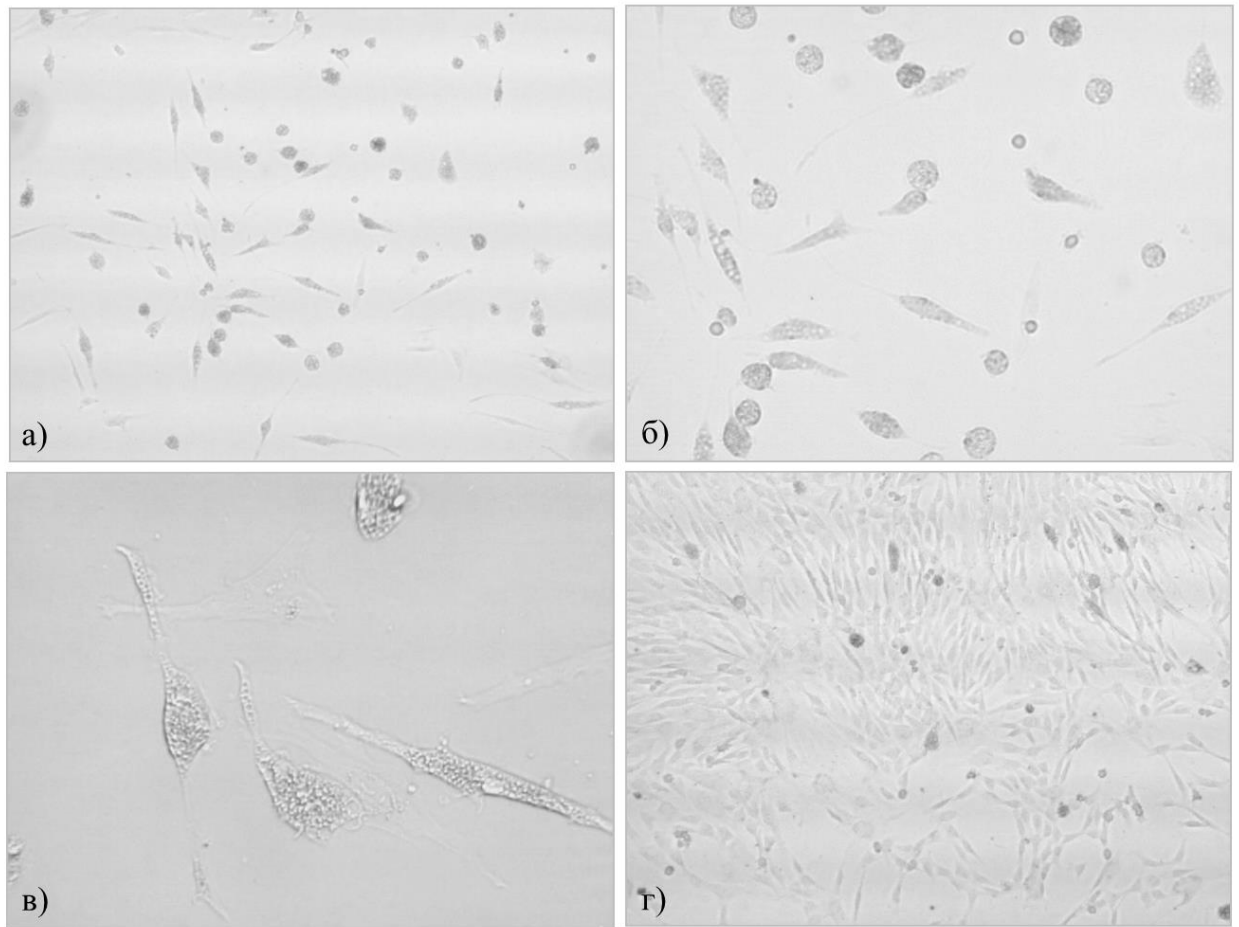
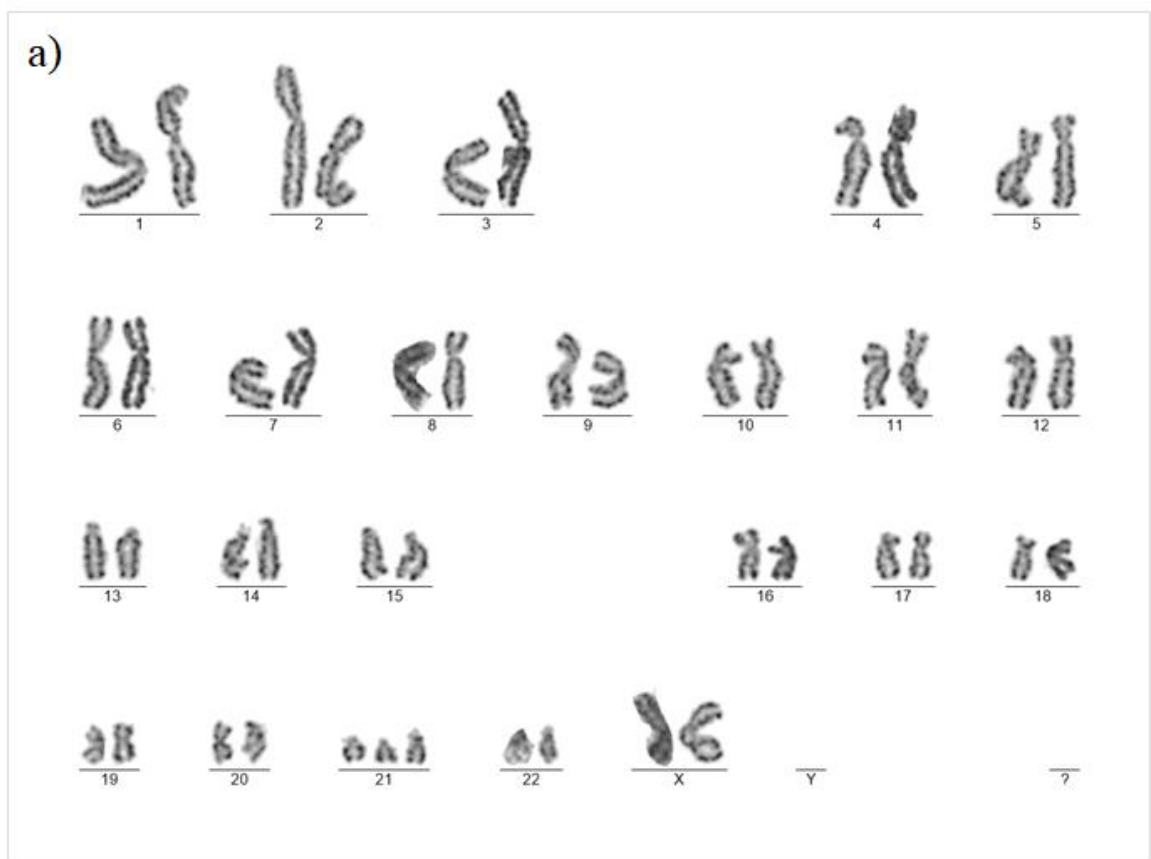


Рис.3.1. Культура мезенхімальних ворсин хоріона: а), б), в) – поодинокі клітини до заміни поживного середовища (збільшення $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$ відповідно), г) колонії клітин через день після заміни поживного середовища, конфлуентність близько 85% (збільшення $\times 5$).

По-четверте, оскільки із 49 досліджених зразків у 12 (24,5%) спостерігався проріст, всі етапи дослідження проводили у стерильних умовах ламінарного боксу, усі ємності, лабораторний посуд та пінцети використовували одноразові та стерилізували декілька разів за допомогою ультрафіолету. Окрім того, оскільки в більшості випадків спостерігалася контамінація мікроскопічними грибами, до проколу в подальшому планується додати пункт щодо використання антимікотичних засобів для її попередження.

Наразі встановлення каріотипу хоріона непрямим методом можливе лише паралельно із використанням іншого методу: прямого або FISH методів. Проте оскільки аналіз культури мезенхімальних ворсин хоріона, на відміну від прямого методу, дозволяє встановити хромосомну патологію завдяки високій якості та більшій кількості отримуваних метафазних пластин, а не лише вказати на її наявність при неможливості розрізнити хромосоми зі схожою етіологією (рис.3.2), метод довгострокового культивування має застосовуватись як основний для встановлення хромосомного набору хоріона.

За модифікованим протоколом створена стандартна операційна процедура культивування мезенхімальних ворсин хоріона і наразі метод впроваджений в діяльність ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія»



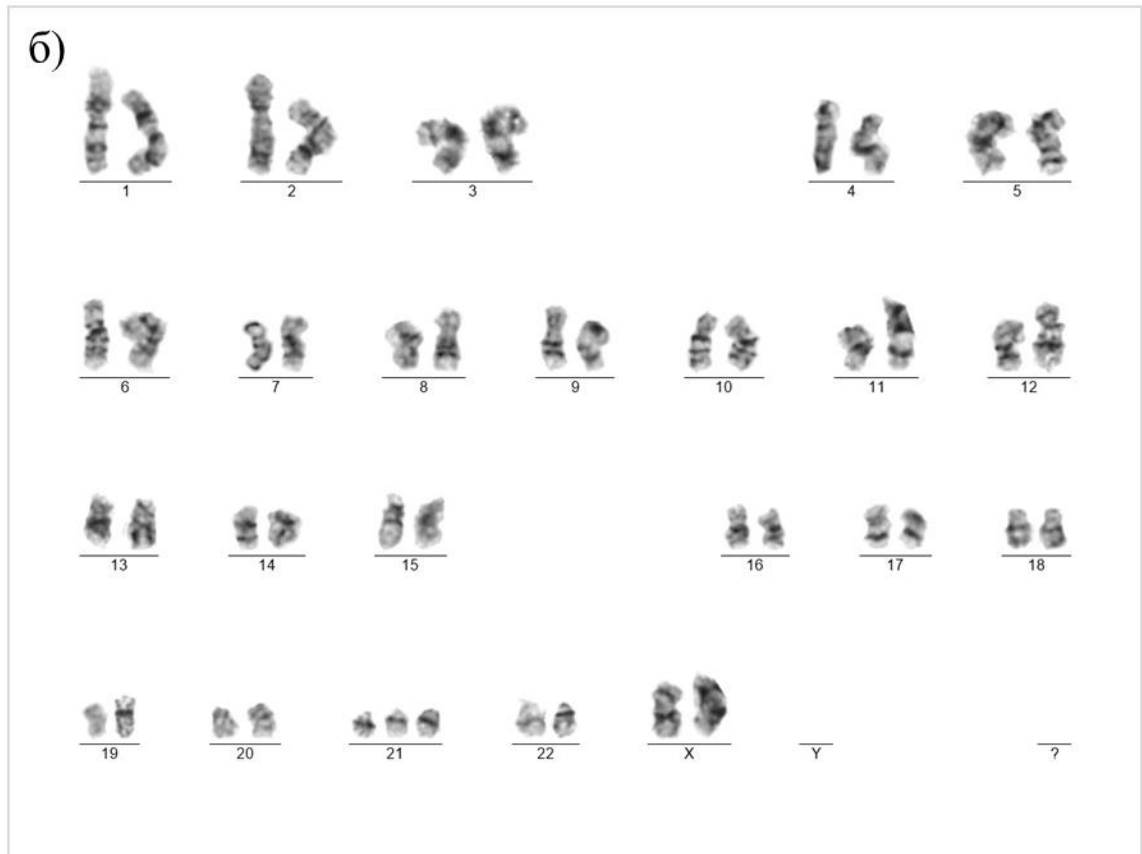


Рис.3.2. Порівняння каріограм зразків, які аналізували: а) прямим методом та б) методом довгострокового культивування; збільшення $\times 1000$, програма аналізу хромосом AneuVision.

3.1.2. Можливість застосування методу для дослідження біоптату хоріона. Метод довгострокового культивування використовували як для дослідження абортного матеріалу, так і для дослідження біоптату хоріона.

Оскільки при отриманні біоптату забирається дуже незначна кількість ворсин хоріона, тривалість культивування мезенхімальних клітин зростає із 5-7 діб до 14, при цьому є необхідність двічі чи тричі замінювати поживне середовище для стимуляції росту клітин, на відміну від одноразової заміни при культивуванні мезенхімальних клітин хоріона, отриманих із абортного матеріалу. Але при цьому зменшується час на отримання суспензії мезенхімальних клітин, адже клітин поодиноких ворсин швидше дезагрегуують. Окрім того, серед таких зразків рідше спостерігається забруднення

еритроцитами, які часто перешкоджають росту культури клітин, отриманих із абортного матеріалу.

3.2. Частоти хромосомних аберацій серед досліджених зразків абортного матеріалу

3.2.1. Частоти хромосомних аберацій серед зразків, досліджених прямим методом та методом FISH. У ході проведеного експерименту було досліджено 38 зразків прямим та FISH методами (табл.3.1). З них прямим методом – 34 зразки, методом FISH – 4 зразки.

Таблиця 3.1

Хромосомний склад зразків хоріона, досліджених прямим та FISH методами

№ зразка	Термін вагітності	Дата отримання	Посадка	Фіксація	Висновок	
					Прямий метод	або FISH
1.		30.05	31.05	05.06	46,XY	
2.		30.05	31.05	07.06	46,XX	
3.		05.06	05.06	10.06	47,XY,+16	
4.	5-6 т.	16.07	17.07	22.07	46,XY	
5.	7-8 т.	19.07	19.07	-	46,XY	
6.	13+5 т.	17.07	17.07	24.07		н*,XY
7.		24.07	24.07	29.07	47,XY,+18	
8.	16-17 т.	25.07	26.07	01.08	46,XY	
9.	8 т.	27.07	29.07	-		45,X
10.	13 т.	29.07	29.07	02.08		47,XY,+21
11.	13+ 4 т.	30.07	30.07	05.08	46,XY	
12.	8 т.	30.07	30.07	02.08	47,XX,+13	
13.	6 т.	13.08	14.08	19.08	47,XY,+22	
14.	8 т.	16.08	16.08	20.08	46,XX	
15.	7 т.	19.08	20.08	27.08	46,XX	
16.	9-10 т.	12.09	12.09	16.09	45,X	
17.	16-17 т.	18.09	19.09	24.09	46,XY	
18.	9-10 т.	02.10	02.10	07.10	46,XX	
19.	10 т.	02.10	02.10	07.10	46,XX	
20.	11-12 т.	04.10	04.10	09.10	45,X	
21.	14 т.	15.10	15.10	24.10	46,XY	
22.	9-10 т.	16.10	17.10	21.10	46,XX	

23.	>12 т.	17.10	17.10	21.10	47,XX,+21
24.	8-9 т.	21.10	21.10	24.10	45, X
25.	7-8 т.	24.10	24.10	-	47,XX,+22
26.	12-13 т.	30.10	30.10	02.11	46,XY
27.	7-8 т.	26.10	26.10	31.10	47,XX,+13
28.	13-14 т.	08.11	09.11	-	46,XY
29.	7-8 т.	10.11	11.11	15.11	47,XY,+9
30.	8 т.	12.11	12.11	-	46,XY
31.	13-14 т.	12.11	12.11	-	46,XY
32.	5-6 т.	30.11	30.11	04.12	45,X
33.	13-14 т.	03.12	03.12	09.12	47,XX,+21
34.	8 т.	04.12	04.12	09.12	46,XY
35.	10 т.	12.12	12.12	16.12	69,XXY
36.	7-8 т.	20.12	20.12	-	н,XX
37.	6-7 т.	17.01	17.01	22.01	46,XX
38.	5-6 т.	20.01	20.01	-	47,XY,+22

Примітка: * – не виявлено ознак анеуплоїдії за хромосомами інтересу (13, 18, 21, X, Y).

Було встановлено, що кількість нормальних чоловічих каріотипів становить 13, а жіночих – 8, це 34,21% та 21, 05% відповідно. Тобто із 38 досліджених каріотипів абортного матеріалу 55 % виявилися нормальними, що підтверджує літературні дані щодо того, що більшість репродуктивних втрат є пов'язаними із хромосомними аномаліями плода і відбуваються саме в першому триместрі вагітності, оскільки більшість досліджених зразків були отримані від жінок в терміні вагітності до 12 тижня включно (24 зразки – 70,59%). При цьому серед 10 зразків, отриманих після 12 тижня вагітності, у 7 випадках каріотип плода виявився нормальним, що може підтверджувати літературні дані про значнішу роль у перериванні вагітності в другому триместрі висхідних інфекцій, а не генетичних аномалій плода.

Серед хромосомних аберацій, що зустрічались в ході дослідження абортного матеріалу прямим та FISH методами, найпоширенішою виявилася моносомія за X хромосомою – синдром Тернера – що була виявлена в 5 випадках (13,16%). Проте основну частину виявлених хромосомних аномалій становили трисомії за аутосомами, з них: трисомія за 21 хромосомою –

3 випадки (7,89%), за 22 – 3 випадки (7,89%), за 13 – 2 випадки (5,26%), за 18, 16 та 9 хромосомами – по 1 випадку (по 2,63%). Був виявлений також єдиний випадок триплоїдії – каріотип 69,XXY (2,63%) (рис.3.3).

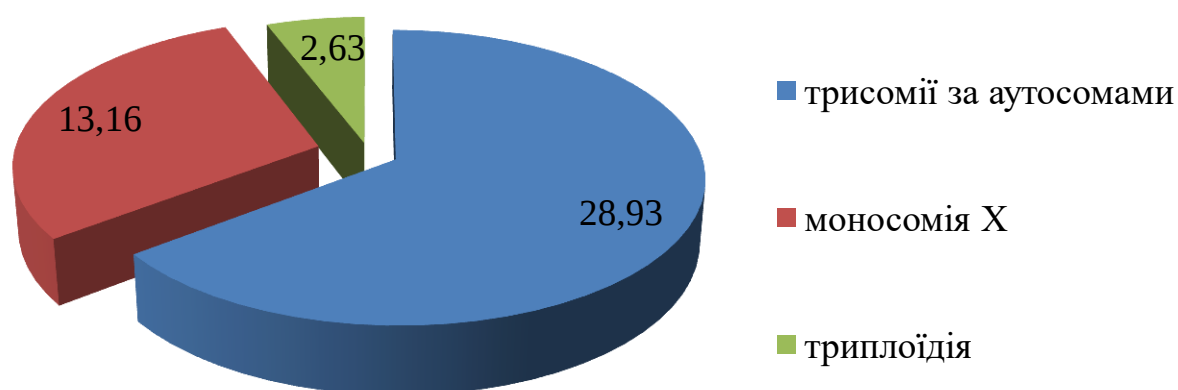


Рис.3.3. Діаграма частот типів хромосомних аберацій (%) серед зразків абортного матеріалу, досліджених за допомогою прямого та FISH методів.

Таким чином, отримані дані повністю відповідають численним літературним даним про те, що найпоширенішим типом хромосомних аномалій серед абортусів є трисомії за аутосомами, особливо – за 21 та 22 хромосомами, а друге й третє місце займають моносомія X та триплоїдії відповідно [3,4,10].

3.2.2. Частоти хромосомних аберацій серед зразків, досліджених непрямим методом. Непрямим методом, або методом довгострокового культивування, в ході проведеного експерименту було досліджено 30 зразків (табл.3.2), більшість яких було отримано від жінок в першому триместрі вагітності (73,08%).

Таблиця 3.2

Хромосомний склад зразків хоріона, досліджених непрямим методом

№ зразка	Термін вагітності	Дата отримання	Посадка	Фіксація	Висновок
1.		30.05	31.05	05.06	46,XY

2.		30.05	31.05	07.06	46,XX
3.		05.06	05.06	10.06	47,XY,+16
4.	5-6 т.	16.07	17.07	22.07	46,XY
5.	13+5 т.	17.07	17.07	24.07	46,XY
6.	16-17 т.	25.07	26.07	01.08	46,XY
7.	13 т.	29.07	29.07	02.08	47,XY,+21
8.	8 т.	30.07	30.07	02.08	47,XX,+13
9.	6 т.	13.08	14.08	19.08	47,XY,+22
10.	8 т.	16.08	16.08	20.08	46,XX
11.	7 т.	19.08	20.08	27.08	46,XX
12.	9-10 т.	12.09	12.09	16.09	45,X
13.	16-17 т.	18.09	19.09	24.09	46,XY
14.	10 т.	02.10	02.10	07.10	46,XX
15.	11-12 т.	04.10	04.10	09.10	45,X
16.	9-10 т.	16.10	17.10	21.10	46,XX
17.	>12 т.	17.10	17.10	21.10	47,XX,+21
18.	6-7 т.	19.10	19.10	23.10	46,XY
19.	12-13 т.	30.10	30.10	02.11	46,XY
20.	7-8 т.	26.10	26.10	31.10	47,XX,+13
21.	5-6 т.	10.11	11.11	15.11	46,XX
22.	5-6 т.	30.11	30.11	04.12	45,X
23.	13-14 т.	03.12	03.12	09.12	47,XX,+21
24.	8 т.	04.12	04.12	09.12	46,XY
25.	10 т.	12.12	12.12	16.12	69,XXY
26.	12 т.	20.12	20.12	26.12	45,X
27.	8-9 т.	15.01	15.01	20.01	69,XXY
28.	7 т.	20.01	20.01	24.01	47,XX,+16
29.		24.01	24.01	30.01	47,XX,+21
30.	8 т.	29.01	29.01	03.02	45,X

Кількість нормальних чоловічих і жіночих каріотипів разом становила 46,67%: з них 8 чоловічих (26,67%) та 6 (20%) жіночих. Серед виявлених хромосомних аномалій найпоширенішою серед абортусів виявилась моносомія за X хромосомою – 5 випадків (16,67%), на другому місці – трисомія за 21 хромосомою – 4 випадки (13,33%), далі трисомії за 16 та 13 хромосомами та триплоїдія 69, XXY – по 2 випадки (по 6,67%) та один випадок трисомії за 22 хромосомою (3,33%) (рис.3.4.).

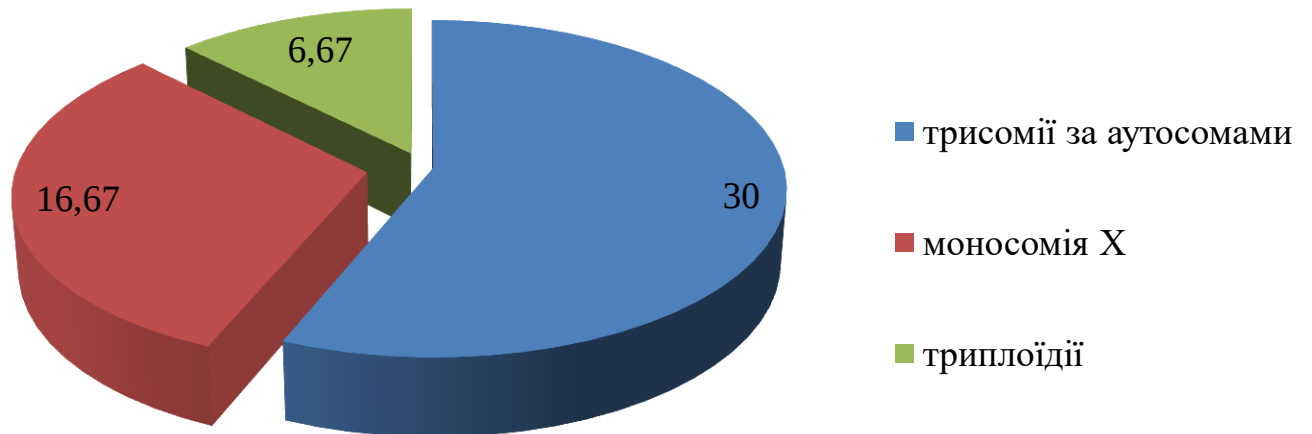
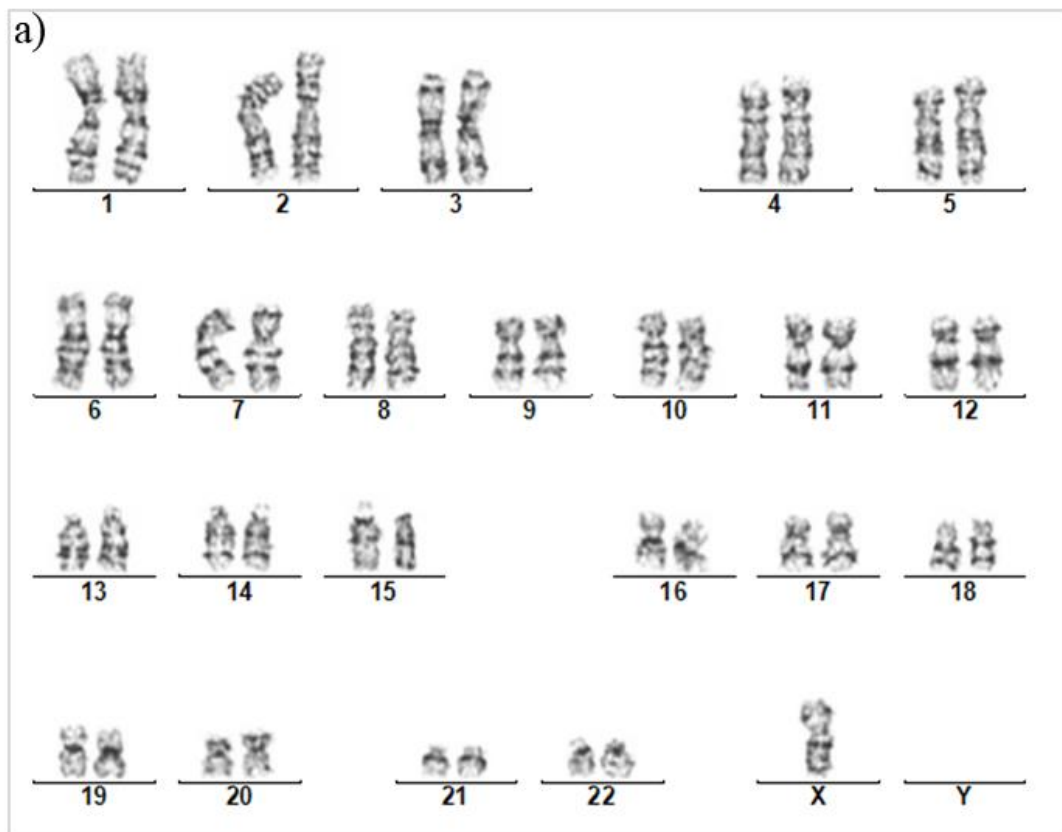


Рис.3.4. Діаграма частот типів хромосомних аберацій (%) серед зразків абортного матеріалу, досліджених за допомогою непрямого методу.

Приклади каріограм найтиповіших хромосомних патологій, виявлених серед зразків абортного матеріалу представлені на рисунку 3.5.



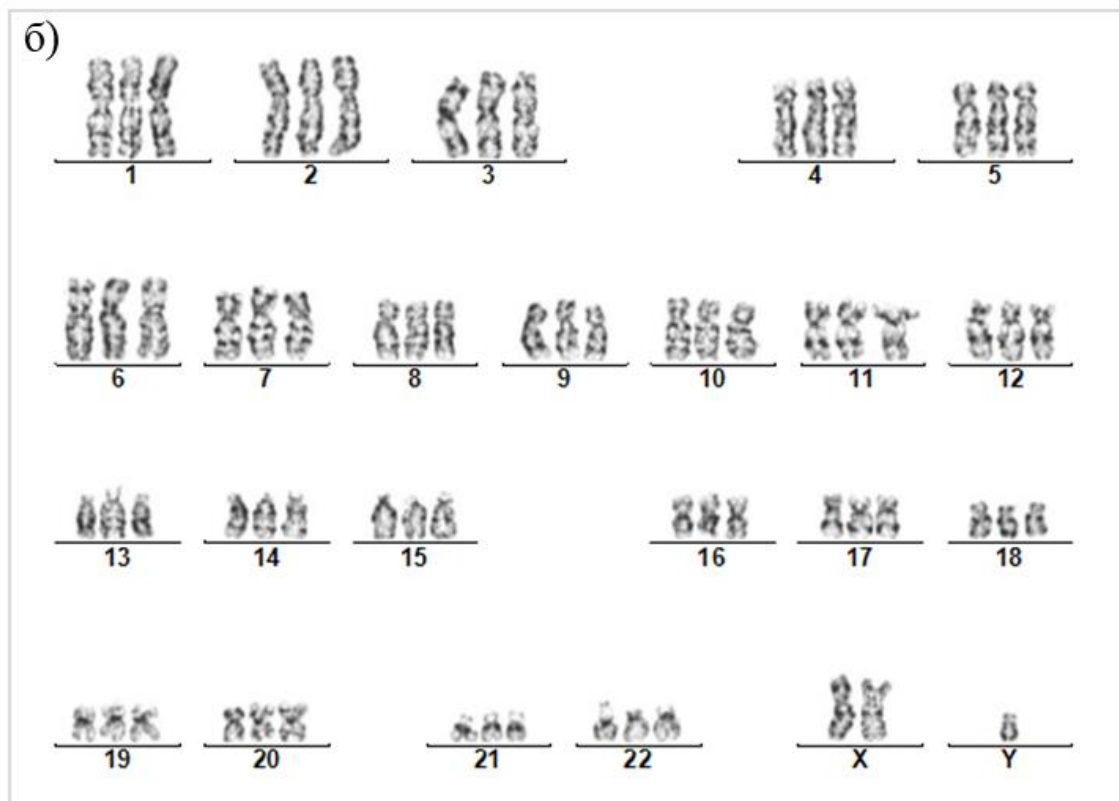


Рис. 3.5. Каріограми зразків: а) №26 із моносомією за Х хромосомою та б) №27 із триплоїдним набором хромосом; збільшення $\times 1000$, програма аналізу хромосом AneuVision.

Таким чином, розподіл частот хромосомних аномалій при дослідженні каріотипу хоріона непрямым методом співпадає із таким розподілом при використанні найпоширенішого серед лабораторій України прямого методу, і відповідає попередньо загаданим літературним даним. Проте варто звернути увагу на те, що кількість нормальних каріотипів є більшою при використанні прямого методу дослідження ворсин хоріона, що може вказувати на ймовірність хибно негативних результатів дослідження, але для підтвердження цього необхідним є значно більший масштаб досліджень.

3.3. Виявлення явища обмеженого плацентарного мозаїцизму

3.3.1. Порівняння результатів досліджень, отриманих прямим та непрямим методами, та методом FISH. В ході експерименту було використано для порівняння 23 зразки ворсин хоріона (табл. 3.3.), каріотип яких досліджували непрямим методом та порівнювали отримані дані із даними прямого методу або методу FISH.

Таблиця 3.3.

Порівняння результатів визначення каріотипу хоріона непрямим методами та прямим і FISH методами

№ зразка	Термін вагітності	Дата отримання	Посадка	Фіксація	Висновок	
					Культура	Прямий метод або FISH
1.		30.05	31.05	05.06	46,XY	46,XY
2.		30.05	31.05	07.06	46,XX	46,XX
3.		05.06	05.06	10.06	47,XY,+16	47,XY,+16
4.	5-6 т.	16.07	17.07	22.07	46,XY	46,XY
5.	13+5 т.	17.07	17.07	24.07	46,XY	н*,XY
6.	16-17 т.	25.07	26.07	01.08	46,XY	46,XY
7.	13 т.	29.07	29.07	02.08	47,XY,+21	47,XY,+21
8.	8 т.	30.07	30.07	02.08	47,XX,+13	47,XX,+13
9.	6 т.	13.08	14.08	19.08	47,XY,+22	47,XY,+22
10.	8 т.	16.08	16.08	20.08	46,XX	46,XX
11.	7 т.	19.08	20.08	27.08	46,XX	46,XX
12.	9-10 т.	12.09	12.09	16.09	45,X	45,X
13.	16-17 т.	18.09	19.09	24.09	46,XY	46,XY
14.	10 т.	02.10	02.10	07.10	46,XX	46,XX
15.	11-12 т.	04.10	04.10	09.10	45,X	45,X
16.	9-10 т.	16.10	17.10	21.10	46,XX	46,XX
17.	>12 т.	17.10	17.10	21.10	47,XX,+21	47,XX,+21
18.	12-13 т.	30.10	30.10	02.11	46,XY	46,XY
19.	7-8 т.	26.10	26.10	31.10	47,XX,+13	47,XX,+13
20.	5-6 т.	30.11	30.11	04.12	45,X	45,X
21.	13-14 т.	03.12	03.12	09.12	47,XX,+21	47,XX,+21
22.	8 т.	04.12	04.12	09.12	46,XY	46,XY
23.	10 т.	12.12	12.12	16.12	69,XXY	69,XXY

Примітка: * – не виявлено ознак анеуплоїдії за хромосомами інтересу

Серед зразків, що порівнювалися, частота розподілу хромосомних аномалій була наступною: найчастіше траплялися зразки із моносомією X та трисомією за 21 хромосомою – по 3 зразки відповідно (по 13,04%), на другому місці за поширеністю виявилася трисомія за 13 хромосомою – 2 випадки (8,7%), далі по одному випадку трисомії за 16, 22 хромосомами та триплоїдія 69,XXY (по 4,35%) (рис.3.6.). При цьому загальна кількість всіх трисомій за аутосомами становила 30,43%. Кількість нормальних каріотипів досягала 12 (52,17%), з них 7 чоловічих (30,43%) та 5 жіночих (21,74%).

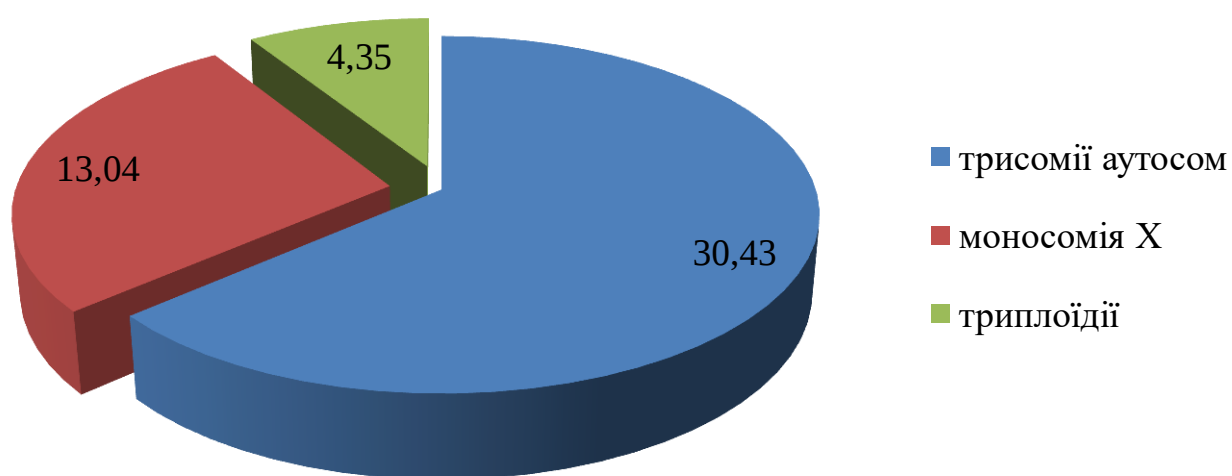


Рис.3.6. Діаграма частот типів хромосомних аберацій (%) серед зразків абортного матеріалу, що порівнювались.

При порівнянні даних, отриманих з використанням різних методів розбіжності між визначеними каріотипами не було встановлено. Тобто, випадки обмеженого плацентарного мозаїцизму серед досліджених зразків не спостерігались. Такий результат можна пов'язати із невеликою вибіркою, адже частота такої патології становить 1-2% [25,45,46,52–54].

Таким чином, дослідження явища ОПМ потребує дуже великої вибірки, близько тисячі зразків, для отримання достовірних статистичних даних та подальшого удосконалення методики непрямого методу довгострокового культивування для попередження великої частоти контамінації зразків,

отримання достатньої кількості метафазних пластин хромосом та відпрацювання методу забарвлення хромосом для коректного цитогенетичного аналізу.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Отже, в ході проведення дослідження початковий протокол було модифіковано, зокрема, змінено час витримки ворсин хоріона в розчинах трипсину-ЕДТА та колагенази, оскільки дезагрегація клітин відбувалась значно раніше за час, зазначений в початковому протоколі і таким чином, було зменшено також руйнівний вплив даних реагентів на живі клітини. Окрім того, заміну поживного середовища для культивування проводили при досягненні конфлуентності близько 70%, тобто коли 70% поверхні дна флакона були покриті колоніями мезенхімальних клітин ворсин хоріона, що досягалось в середньому на 3-5 день культивування (в разі використання як зразка абортного матеріалу). Таким чином, було досягнуто зменшення часу, що витрачався на посадку культури та підвищено кількість і якість отримуваних препаратів метафазних пластин, що також скоротило час аналізу необхідної для встановлення діагнозу кількості метафазних пластин.

За модифікованим протоколом була створена стандартна операційна процедура, яка наразі впроваджена в діяльність ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія». Проте, оскільки у 24,5% випадків спростерігалась контамінація культури (здебільшого мікроскопічними грибами) згаданий метод використовується лише в парі із прямим методом або методом FISH. У подальшому планується використовувати антимікотичні засоби для попередження контамінації та використання методу довгострокового культивування як основного, оскільки кількість отримуваних метафазних пластин, а особливо їх якість значно перевищують таку при дослідженні абортного матеріалу прямим методом, який зараз є найпоширенішим серед лабораторій України.

Окрім того, протокол було адаптовано і для використання при дослідженні зразків біоптату хоріона. Оскільки в цьому випадку кількість матеріалу є значно меншою – зазвичай становить 2-3 ворсини, час

культивування подовжили до 14 діб, середовище при цьому змінювали 2-3 рази, в залежності від кількості утворених колоній мезенхімальних клітин.

Зразки абортного матеріалу, отримані лабораторією аналізували прямим або методом FISH, залежно від методу, вказаного лікарем у направленні та паралельно застосовували непрямий метод, тобто метод довгострокового культивування і в межах цих двох груп визначили частоту хромосомних аберацій, що призводили до переривання вагітності.

Було встановлено, що серед зразків, які аналізували прямим або FISH методами та непрямим методом (культивування), 45% та 46,67% зразків відповідно характеризувались аномальним каріотипом, при чому більшість із них були отримані від жінок, що знаходились в першому триместрі вагітності. Таким чином, отримані дані повністю підтверджують численні літературні дані щодо того, що більшість репродуктивних втрат відбуваються саме в першому триместрі вагітності, в той час як в другому, наприклад, частішою причиною невиношування стають висхідні інфекції, також те, що основною причиною репродуктивних втрат все ж таки є генетичні аномалії плода.

Серед аномальних каріотипів, що зустрічались в ході дослідження абортного матеріалу прямим та FISH методами, найпоширенішою виявилася моносомія за X хромосомою – синдром Тернера – що була виявлена в 5 випадках (13,16%). Проте основну частину виявлених хромосомних аномалій становили трисомії за аутосомами, з них: найчастіше трисомія за 21 та 22 хромосомами – по 3 випадки (по 7,89%), а також за 13 – 2 випадки (5,26%), за 18, 16 та 9 хромосомами – по 1 випадку (по 2,63%). Був виявлений також єдиний випадок триплоїдії – каріотип 69,XXY (2,63%).

Серед зразків, що досліджували непрямим методом (культивування) найпоширенішою виявилась також моносомія за X хромосомою – 5 випадків (16,67%), на другому місці – трисомія за 21 хромосомою – 4 випадки (13,33%), далі трисомії за 16 та 13 хромосомами та триплоїдія 69, XXY – по 2 випадки (по 6,67%) та один випадок трисомії за 22 хромосомою (3,33%).

Серед зразків які аналізували одночасно обома методами (прямий або FISH та непрямий паралельно) розподіл частот хромосомних аномалій серед абортусів був аналогічним: найчастіше траплялися зразки із моносомією X та трисомією за 21 хромосомою – по 3 зразки відповідно (по 13,04%), на другому місці трисомія за 13 хромосомою – 2 випадки (8,7%), і по одному випадку трисомії за 16, 22 хромосомами й триплоїдія 69,XXY (по 4.35%).

При порівнянні даних, отриманих із використанням різних методів очікували отримати певні розбіжності із огляду на існування явища обмеженого плацентарного мозаїцизму. Суть цієї патології полягає у відмінності каріотипів клітин плода та клітин провізорних органів, при цьому аномалії каріотипу обмежуються саме клітинами провізорних органів, в той час як плід є абсолютно нормальним генетично. Саме застосування одночасно прямого і непрямого методу аналізу абортного матеріалу і дає змогу виявити ОПМ, оскільки досліджуються дві клітинні лінії: цитотрофобластні клітини ворсин, які походять від трофоектодерми та мезенхімальні клітини строми, які походять від екстраембріональної мезенхіми внутрішньої клітинної маси.

В ході дослідження при порівнянні даних, отриманих з використанням різних методів розбіжності між визначеними каріотипами встановлено не було. Тобто, випадки обмеженого плацентарного мозаїцизму серед досліджених зразків не спостерігались. Отриманий результат пов'язаний із незначною кількістю аналізованих зразків, тобто замалою вибіркою. Оскільки частота патології ОПМ становить 1-2%, вибірка має бути значною для отримання достовірних статистичних даних, а тому це явище потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Модифіковано метод довгострокового культивування мезенхімальних клітин ворсин хоріона.
2. Розроблено стандартну операційну процедуру для даного методу та впроваджено його в діяльність ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія».
3. Встановлено, що серед зразків, досліджених непрямим методом та прямим і FISH методами, частота різних типів хромосомних аберацій є наступною: частота трисомій за аутосомами є найвищою, становить 28,93% та 30% відповідно (найчастіше 21 та 22 хромосоми), на другому місці за частотою – моносомія за X хромосомою, що зустрічається в 16,67% та 13,04% випадків відповідно, на третьому – триплоїдія 69, XXУ, що спостерігалась в 2, 63% та 6,67% випадків відповідно.
4. Не встановлено наявності явища обмеженого плацентарного мозаїцизму серед 23 зразків ворсин хоріона, каріотип яких встановлювали з використанням двох різних способів, адже його частота становить 1-2%, що потребує значно більшої вибірки і подальших досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New Insights Into Mechanisms Behind Miscarriage. BMC Med [Internet]. 2013;11(154):1–10. Available from: BMC Medicine
2. Воробйова П, Живецька-Денисова АА, Ткаченко ВБ, Рудакова НВ, Толкач СМ. Невиношування Вагітності: Сучасні Погляди на Проблему. Здоров'я Жінки. 2017;3(119):113–7.
3. Ведищев СИ, Прокопов АЮ, Жабина УВ, Османов ЭМ. Современные Представления о Причинах Невынашивания Беременности. Вестник ТГУ. 2013;18(4):1309–12.
4. Gersen SL. Clinical Cytogenetics. Second Edi. Humana Press, Totowa, NJ; 2005. 323-345 p.
5. Богданова ГС, Зайдиева ЗС, М МД, Заякин ВА. Невынашивание Беременности: Общий Взгляд на Проблему. Медицинский Совет. 2012;1(3):67–71.
6. Дударенкова МР, Гладунова ЕП, Кшнясева СК, Горбунова ЕС. Медико - социальные Аспекты Невынашивания Беременности. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2015;17(2):22–4.
7. Спиридонова НВ, Калинкина ОБ, Гильмиярова ФН, Мелешкина ОИ. Взаимосвязь Неразвивающейся Беременности с Хромосомной Патологией Плода. Казанский медицинский журнал. 2009;94(5):97–9.
8. Кухарчик ЮВ, Гутикова ЛВ. Современные Методы Диагностики Невынашивания Беременности ранних Сроков. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2012;4(1):23–5.
9. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic Factors as a Cause of Miscarriage. Curr Med Chem. 2010;17(29):3431–7.
10. Барабашева СС. Неразвивающаяся Беременность: Взгляд на Проблему. Obstet Gynecol News, Opin Train. 2018;6(4):92–6.
11. Ткаченко ЛВ, Костенко ТИ, Углова НД, Шкляр АЛ.

Невынашивание Беременности. Вестник ВолгГМУ. 2015;1(53):3–9.

12. Hardy PJ, Hardy K. Chromosomal Instability in First Trimester Miscarriage : a Common Cause of Pregnancy Loss? Transl Pediatr. 2018;7(3):211–8.

13. Авраменко НВ, Барковский ДЕ, Семененко ИВ, Калабухова НА. Цитогенетический Анализ Хориона При Неразвивающейся Беременности по Материалам Регионального Репродуктивного Центра. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2015;3(19):6–10.

14. Чиряева ОГ, Петрова ЛИ, Садик НА, Дудкина ВС, Пендина АА, Федорова ИД, et al. Цитогенетический Анализ Хориона при Неразвивающейся Беременности. Журнал Акушерства и Женских Болезней. 2007;56(1):35–45.

15. Харченко ТВ, Ильин АБ, Абашин ВГ. Цитогенетические Аспекты Невынашивания Беременности и эмбриональных Потерь при Вспомогательных Репродуктивных Технологиях. Журнал Акушерства и Женских Болезней. 2003;52(1):72–7.

16. Volkov AN, Rytenkova OI, Babarykina TA, Lysenko DI. Цитогенетическая Диагностика Хромосомных Аномалий при Неразвивающейся Беременности. Клиническая Лабораторная Диагностика. 2017;62(9):553–6.

17. Кузнецова ТВ. Пренатальное Кариотипирование — Методы, Проблемы и Перспективы. Журнал Акушерства и Женских Болезней. 2007;56(1):120–8.

18. Тихомирова СВ, Диунов АГ, Палютина ЕЮ, Мешкова АК, Смирнова НА. Анализ Аномалий Кариотипа Плода При Неразвивающейся Беременности, Наступившей Естественным Путем. Вестник Ивановской медицинской академии. 2015;20(2):34–9.

19. Soler A, Morales C, Mademont-Soler I, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages : A Series of 1 ,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes. Cytogenet Genome Res. 2017;1(152):81–9.

20. Ramalho C, Matias A, Carvalho B, Do S, Barros A, Carvalho F. Aneuploidies Detection in Miscarriages and Fetal Deaths Using Multiplex Ligation-

Dependent Probe Amplification : an Alternative for Speeding Up Results ? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010;153(10):151–5.

21. Гонтарь ЮВ, Ильин ИЕ, Парницкая ОИ. Роль Цитогенетического Обследования Семейной Пары и Абортивного Материала при Случае Замершей Беременности. Вісник проблем біології і медицини. 2014;3(110):73–7.

22. Berg MMJ Van Den, Maarle MC Van, Wely M Van, Goddijn M. Genetics of Early Miscarriage. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2012;1822(12):1951–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.001>

23. Кулавский ВА, Фролов АЛ, Михайлова СА, Магадеева РР. Роль Цитогенетических Исследований При Неразвивающейся Беременности. Вестник РУДН. 2009;1(7):59–63.

24. Genbacev O, Vicovac L, Larocque N, Sciences R, Francisco S, Francisco S. The Role of Chorionic Cytotrophoblasts in the Smooth Chorion Fusion With Parietal Decidua. Placenta. 2016;36(7):716–22.

25. Лебедев ИН, Назаренко СА. Тканеспецифичный Плацентарный Мозаицизм по Аутосомным Трисомиям у Спонтанных Абортусов Человека : Механизмы Формирования и Фенотипические Эффекты. Генетика. 2001;37(11):1459–74.

26. Баранов ВС, Кузнецова ТВ. Цитогенетика Эмбрионального Развития Человека. Санкт-Петербург: Издательство Н-Л; 2007. 217-246 p.

27. Ferreira MSV, Bienert M, Müller K, Rath B, Goecke T, Opländer C, et al. Comprehensive Characterization of Chorionic Villi-Derived Mesenchymal Stromal Cells From Human Placenta. Stem Cells Resaerch Ther. 2018;9(28):1–17.

28. Shetty S, Gogate A, Gogate S, Malet P. A Reproducible Modified Method for Direct Preparation of Chorionic Villi Cytogenetic Analysis. Methods Cell Sci. 2004;25(1):149–54.

29. Breman A of CVS for MCA and CMA, Patel A. Preparation of Chorionic Villus Samples for Metaphase Chromosome Analysis and Chromosomal Microarray Analysis. Curr Protoc Hum Genet. 2012;12(10):1–9.

30. Sardesai VS, Shafiee A, Fisk NM, Pelekanos RA. Avoidance of Maternal Cell Contamination and Overgrowth in Isolating Fetal Chorionic Villi Mesenchymal Stem Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(1):1070–84.
31. Yong PJ, Mcfadden DE, Robinson WP. Developmental Origin of Chorionic Villus Cultures From Spontaneous Abortion and Chorionic Villus Sampling. *J Obstet Gynaecol Canada* [Internet]. 2011;33(5):449–52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)34877-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163(16)34877-0)
32. Fleischer AC. Fleischer`s Sonography in Obstetrics and Gynecology: Textbook and Teaching Cases. Eighth. New York: McGraw-Hill Education; 2018. 1425 p.
33. Gonzalez PL, Carvajal C, Cuenca J, Alcayaga-Miranda F, Figueroa F, Bartolucci J, et al. Chorion Mesenchymal Stem Cells Show Superior Differentiation, Immunosuppressive, and Angiogenic Potentials in Comparison With Haploidentical Maternal Placental Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(1):1109–21.
34. Mathews S, Rao KL, Prasad KS, Kanakavalli MK, Reddy AG, Raj TA, et al. Propagation of Pure Fetal and Maternal Mesenchymal Stromal Cells From Terminal Chorionic Villi of Human Term Placenta. *Sci Rep* [Internet]. 2015;15(5):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep10054>
35. Katsiani E, Garas A, Skentou C, Tsezou A, Messini CI, Dafopoulos K, et al. Chorionic Villi Derived Mesenchymal Like Stem Cells and Expression of Embryonic Stem Cells Markers During Long-Term Culturing. *Cell Tissue Bank.* 2016;1–13.
36. Simoni G, Fraccaro M. Does Confined Placental Mosaicism Affect The Fetus? *Hum Reprod.* 1992;7(2):139–40.
37. Smidt-Jensen S, Christensen B, Lind A-M. Chorionic Villus Culture for Prenatal Diagnosis of Chromosome Defects : Reduction of the Long-Term Cultivation Time. *Prenat Diagn.* 1989;9(1):309–19.
38. Lebedev I. Aneuploidy at Different Life Stages : Embryonic and Prenatal Mosaic Aneuploidy in Early Fetal Losses. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(1):169–

83.

39. Gardo S, Bajnoczky K. Cytogenetic Analysis of Spontaneous Abortions With Direct Analysis of Chorionic Villi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1992;47(1):117–20.

40. Garimberti E, Tosi S. Fluorescence in situ Hybridization (FISH), Basic Principles and Methodology. *Methods Mol Biol.* 2010;659(1):3–20.

41. Cui C, Shu W, Li P. Fluorescence In situ Hybridization : Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4(89):1–11.

42. Ratan ZA, Zaman S Bin, Mehta V, Haidere MF. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus.* 2017;9(6):1–13.

43. Bishop R. Applications of Fluorescence in Situ hybridization (FISH) in Detecting Genetic Aberrations of Medical Significance. *Biosci Horizons.* 2010;3(1):85–95.

44. Sinclair A. Genetics 101: Cytogenetics and FISH. *Can Med Assoc J.* 2002;167(4):373–4.

45. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK. The Origin , Mechanisms , Incidence and Clinical Consequences of Chromosomal Mosaicism in Humans. *Hum Reprod Update.* 2014;20(4):571–81.

46. Wilkins-haug L, Quade B, Morton CC. Confined Placental Mosaicism as a Risk Factor Among Newborns With Fetal Growth Restriction. *Prenat Diagn.* 2006;26(1):428–32.

47. Wilkins-haug L, Roberts DJ, Morton CC. Confined Placental Mosaicism and Intrauterine Growth Retardation : a Case-Control Analysis of Placentas at Delivery. *Obstet Gynecol.* 1995;172(1):44–50.

48. Grati FR, Ferreira J, Benn P, Izzi C, Verdi F, Vercellotti E, et al. Outcomes in Pregnancies With a Confined Placental Mosaicism and Implications for Prenatal Screening Using Cell-Free DNA. *Genet Med [Internet].* 2019;19(8):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0630-y>

49. Kim KS. Genetic Counseling for Confined Placental Mosaicism : A Case Report. *J Genet Couns*. 1998;7(2):187–94.
50. Kalousek DK, Vekemans M. Confined Placental Mosaicism. *J Med Genet*. 1996;33(1):529–33.
51. Гордієнко ІЮ, Нікітчина ТВ, Ващенко ОО, Тарапурова ОМ, Величко АВ, Болюх ВМ. Обмежений Плацентарний Мозаїцизм : Механізми Утворення та Перспективи Прогнозування. *Перинатология и Педиатрия*. 2014;4(60):14–7.
52. Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miscovic B, Kurjak A. Correlation of Confined Placental Mosaicism with Fetal Intrauterine Growth Retardation: A Case Control Study of Placentas at Delivery. *Fetal Diagn Ther*. 2001;1(16):4–9.
53. Phillips OP, Tharapel AT, Lerner JL, Park VM, Wachtel SS, Shulman LP. Risk of Fetal Mosaicism When Placental Mosaicism is Diagnosed by Chorionic Villus Sampling. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(3):850–5.
54. Schreck RR, Falik-borenstein Z. Chromosomal Mosaicism in Chorionic Villus Sampling. *Clin Prenatology*. 1990;17(4):867–88.
55. Barnette T, Horovitz J, Saura R. Confined Placental Mosaicism and Pregnancy Outcome : a Distinction Needs to be Made Between Types 2 and 3. *Prenat Diagn*. 2010;30(1):1155–64.
56. Lestou VS, Kalousek DK. Confined Placental Mosaicism and Intrauterine Fetal Growth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998;79(1):223–6.
57. Hahnemann JM, Vejerslev LO. European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUCROMIC)— Fetal and Extrafetal Cell Lineages in 192 Gestations With CVS Mosaicism Involving Single Autosomal Trisomy. *Am J Med Genet*. 1997;70(9):179–87.
58. Ledbetter DH, Zachary M, Simpson L, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, et al. Cytogenetic Results From The U.S . Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn*. 1992;12(6):317–45.
59. Lebedev IN, Ostroverkhova N V, Nikitina T V, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Molecular Cytogenetic Characteristics of Chromosome Imbalance in

Spontaneous Human Abortion Cells with Low Proliferative Activity in Vitro. *Russ J Genet.* 2003;39(8):934–43.

60. Toutain J, Goutte-gattat D, Horovitz J, Saura R. Confined Placental Mosaicism Revisited : Impact on Pregnancy Characteristics and Outcome. *PLoS One.* 2018;13(4):1–11.