

Л.Я. ПИЛИП¹, Л.А. СПИНЕНКО², В.Д. ЗУКИН², Н.М. БИЛЬКО¹¹ Центр молекулярных и клеточных исследований Национального университета «Киево-Могилянская академия», Киев

E-mail: l.pylyp@ivf.com.ua

² Клиника репродуктивной медицины «Надия», Киев

ОСОБЕННОСТИ МЕЙОТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ ХРОМОСОМ 13 И 14 У ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ НОСИТЕЛЕЙ РОБЕРТСОНОВСКОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ $der(13;14)(q10;q10)$

*Представлены результаты исследования особенностей мейотической сегрегации хромосом 13 и 14 в сперматозоидах пяти гетерозиготных носителей робертсоновской транслокации $der(13;14)$ методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. Выявлено преобладание альтернативного типа сегрегации хромосом ($78,2 \pm 5,7\%$) с незначительным варьированием частот сбалансированных сперматозоидов ($69,4-86,5\%$). Сегрегацию по совместному типу с образованием несбалансированных гамет выявляли в $18,64 \pm 4,90\%$ сперматозоидов, по типу 3:0 – в $2,48 \pm 1,20\%$ сперматозоидов. Полученные результаты можно использовать для медико-генетического консультирования гетерозиготных носителей робертсоновской транслокации $der(13;14)$, особенно для прогнозирования вероятности получения нормальных/сбалансированных эмбрионов при проведении циклов вспомогательных репродуктивных технологий.*

Ключевые слова: бесплодие, робертсоновские транслокации, сегрегация хромосом.

Введение. В структуре хромосомной патологии у мужчин с бесплодием одно из основных мест принадлежит структурным перестройкам, в частности робертсоновским транслокациям, которые образуются при слиянии длинных плеч акроцентрических хромосом. Потеря коротких плеч хромосом не имеет фенотипического проявления, поскольку гены, локализованные в их районах, также закодированы в коротких плечах других акроцентрических хромосом. Общепопуляционная частота робертсоновских транслокаций составляет $0,001\%$ [1], а в группе мужчин с бесплодием – $2-3\%$ [2]. Из возможных десяти комбинаций пяти акроцентрических хромосом наиболее часто выявляют робертсоновскую транслокацию с вовлечением хромосом 13 и 14 – $der(13;14)$, составляющую 75% всех негомологичных робертсоновских

транслокаций [3]. Вторая по частоте робертсоновская транслокация $der(14;21)$ составляет 10% ; в остальных случаях определяют перестройки с вовлечением других акроцентрических хромосом. Робертсоновские транслокации с вовлечением гомологичных хромосом выявляют крайне редко.

Носители робертсоновских транслокаций фенотипически нормальны. У мужчин возможны нарушения сперматогенеза, проявляющиеся в снижении концентрации, подвижности сперматозоидов, а также ухудшении их морфологических характеристик. Фенотипическое проявление робертсоновских транслокаций у мужчин может варьировать от азооспермии до астенозооспермии. Носители транслокации $der(13;14)$ не обязательно имеют нарушения сперматогенеза. Частота робертсоновских транслокаций $der(13;14)$ в группе фертильных доноров спермы практически не отличается от популяционной, что свидетельствует о том, что часть носителей перестройки не имеют фенотипического проявления [4].

У гетерозиготных носителей робертсоновских транслокаций повышен риск невынашивания или рождения детей с хромосомной патологией вследствие образования несбалансированных гамет. В профазе I мейоза хромосомы, вовлеченные в перестройку, и хромосомы-гомологи образуют триваленты [5, 6], тип анафазного расхождения которых определяет образование сбалансированных или несбалансированных гамет. При альтернативном типе сегрегации (Alt) образуются нормальные/сбалансированные сперматозоиды. Совместный (Adj) тип сегрегации приводит к образованию гамет с нуллисомиями или дисомиями хромосом 13 или 14 и в случае оплодотворения – зигот с моносомиями или трисомиями хромосом 13 или 14. Результатом сегрегации по типу 3:0 является

образование гамет с двойными дисомиями и моносомиями (рисунок).

Эмпирические частоты несбалансированных гамет у носителей робертсоновских транслокаций отличаются от теоретических и по данным разных авторов составляют 11–37 % [7, 8]. У мужчин – носителей робертсоновских транслокаций особенности сегрегации хромосом можно исследовать с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на деконденсированных ядрах сперматозоидов. FISH-исследование сперматозоидов позволяет индивидуально оценить соотношение сбалансированных и несбалансированных сперматозоидов у каждого носителя транслокации. Этот метод является высокоинформативным при проведении медико-генетического консультирования, особенно в отделениях вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), поскольку позволяет индивидуализировать вероятность получения сбалансированных эмбрионов в циклах ВРТ.

Цель настоящей работы – проанализировать особенности сегрегации хромосом 13 и 14 в гаметах пяти мужчин, носителей наиболее частой робертсоновской транслокации *der*(13;14).

Материалы и методы. Кариотип 45,XY,*der*(13;14)(q10;q10) выявлен у пяти мужчин, не имеющих между собой кровных связей и об-

ратившихся в Клинику репродуктивной медицины «Надия» в связи с бесплодием. Цитогенетическое исследование проводили на ФГА-стимулированных лимфоцитах периферической крови. Анализировали 20 GTG-окрашенных метафазных пластин с минимальным разрешением 550 дисков на гаплоидный геном согласно Международной номенклатуре хромосом человека (ISCN 2009) [9]. При подозрении на мозаицизм количество проанализированных пластин увеличивали до 50. Полиморфизм гетерохроматиновых районов хромосом рассматривали как вариант нормы.

При оценке эякулята руководствовались требованиями Всемирной организации здравоохранения (WHO, 2010) [10]. Заключение «олигозооспермия» ставили при концентрации сперматозоидов менее $15 \cdot 10^6/\text{мл}$; «астеноспермия» – в случаях снижения подвижности у более 32 % сперматозоидов; «тератоспермия» – в случаях обнаружения морфологических аномалий у более 96 % сперматозоидов.

Для проведения FISH активно-подвижную фракцию сперматозоидов обрабатывали фиксатором Карнуа, проводили деконденсацию ядер в 1 N растворе NaOH с последующей дегидратацией стекол в 70- и 96%-ном растворах этилового спирта. Гибридизационную смесь гото-

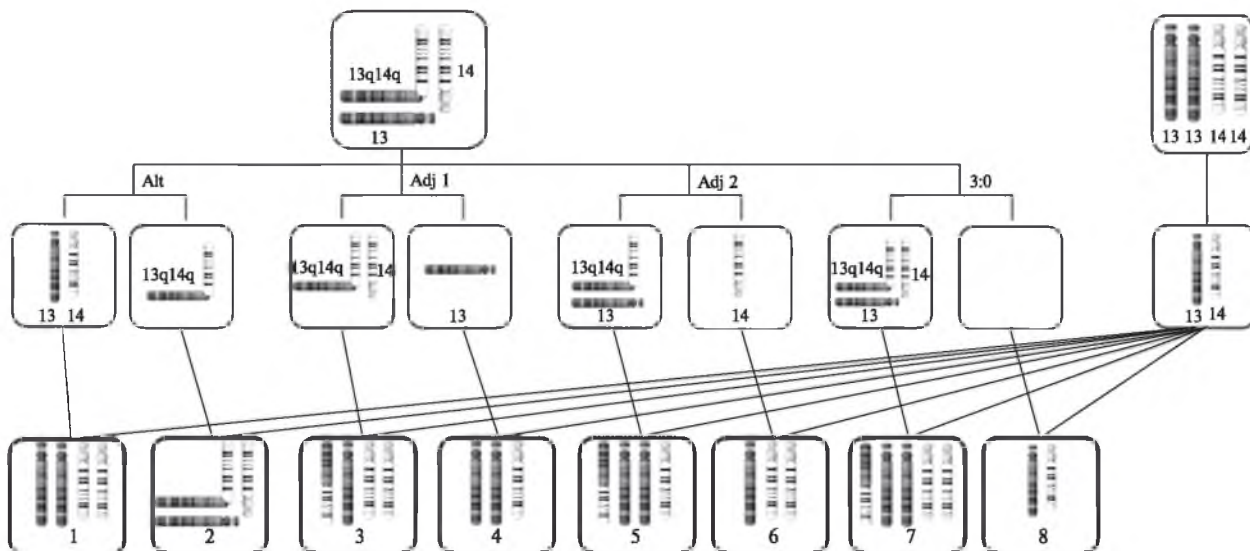


Схема сегрегации хромосом у носителей робертсоновской транслокации *der*(13;14) и образования зигот после оплодотворения сперматозоидами с определенным набором хромосом: с нормальным (1) и сбалансированным (2) кариотипом; с трисомией (3) и моносомией (4) хромосомы 14; с трисомией (5) и моносомией (6) хромосомы 13; с трисомией хромосомы 13 и 14 (7); с моносомией хромосомы 13 и 14 (8)

вили из локус-специфической пробы к району q34 хромосомы 13 (LSI 13q34, SpectrumOrange, «Vysis», США) и теломерной пробы к длинному плечу хромосомы 14 (Tel14q, SpectrumGreen, «Cytocell», США) в гибридационном буфере («Vysis», США). Образцы денатурировали в 0,25%-ном растворе формамида в 2×SSC. Для гибридизации использовали прибор HybriMax, «Abbott Molecular», США. После гибридизации стекла промывали в 0,4×SSC/0,3 % NP-40 (pH 7) в течение 2 мин при температуре 72 °С, далее в 2×SSC/0,1 % NP-40 (pH 7) в течение 1 мин при комнатной температуре. Предметные стекла покрывали 4'6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI II, «Vysis», США). Для микроскопии использовали микроскоп с флуоресцентной насадкой AxioImagerM1 («Zeiss», Германия), до-

кументирование осуществляли с помощью программного обеспечения Isis (MetaSystems). Оценивали препараты с гибридационной эффективностью более 99 %. Перекрывающиеся сперматозоиды и сперматозоиды с нарушением целостности головки не учитывали.

Статистическую обработку данных проводили в MsExcel. Для сравнения частот использовали критерий χ^2 .

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование мейотической сегрегации у носителей структурных хромосомных перестроек высокоинформативно для медико-генетического консультирования. Существуют несколько подходов к определению частот сегрегационных вариантов у носителей робертсоновских транслокаций: межвидовое оплодотворение с изуче-

Таблица 1. Лабораторно-клиническая характеристика пациентов с кариотипом 45,XY,der(13;14)(q10;q10)

№ пациента	Возраст, годы	Концентрация сперматозоидов, $\times 10^6/\text{мл}$	Характеристика эякулята	Анамнез
1	33	58	Астенотератозооспермия	Вторичное бесплодие
2	31	215	Астенозооспермия	Второй самопроизвольный аборт
3	36	4	Олигоастенотератозооспермия	Первый самопроизвольный аборт
4	38	5	То же	Первичное бесплодие
5	27	8	»	Первичное бесплодие

Таблица 2. Частоты вариантов сегрегации хромосом 13 и 14 в сперматозоидах мужчин с кариотипом 45,XY,der(13;14)(q10;q10)

Тип сегрегации и хромосомный набор	Сбалансированность кариотипа	Пациент					Среднее
		1	2	3	4	5	
Alt							
13–14 der(13;14)	Сбалансированный	78,4	75,5	81,2	86,5	69,4	78,20 \pm 5,7
Adj							
13–der(13;14)	Дисомия 13	3,2	4,1	3,8	3,1	7,3	4,30 \pm 1,5
14–	Нуллисомия 13	5,4	5,3	4,2	3,2	8,6	5,34 \pm 1,8
14–der(13;14)	Дисомия 14	4,8	6,1	2,9	4,3	5,9	4,80 \pm 1,2
13–	Нуллисомия 14	6,9	4,4	3,6	1,7	4,4	4,20 \pm 1,7
сумма		20,3	19,9	14,5	12,3	26,2	18,64 \pm 4,9
3:0/2n							
13–14–der(13;14)	Дисомия 13, дисомия 14, 2n	1,4	2	3,7	1,1	4,2	2,48 \pm 1,2
Другие		0,1	0,8	0,6	0,1	0,2	0,36 \pm 0,3

нием кариотипа зигот [11], инъекция сперматозоидов в мышинные ооциты с последующим цитогенетическим исследованием зигот [12] или скрининг сперматозоидов мужчин-носителей с использованием зондов для FISH [13]. Последний позволяет быстро и эффективно исследовать значительное количество сперматозоидов в краткие сроки, что обуславливает наиболее широкое его применение. Тем не менее объем исследований сегрегации хромосом у носителей робертсоновских транслокаций ограничен, что обусловлено низкой популяционной частотой этого типа перестроек. Более того, результаты изучения сегрегации негомогенны и обычно состоят из единичных случаев [14, 15] либо групп из 5–11 пациентов [7, 16, 17].

Результаты исследования эякулята и лабораторно-клиническая характеристика пациентов с кариотипом 45,XY,der(13;14)(q10;q10) представлены в табл. 1.

Использование двухцветной смеси проб для хромосом 13 и 14 позволило определять сперматозоиды с нормальным/сбалансированным набором хромосом (несущие один красный и один зеленый сигнал) и сперматозоиды с несбалансированным хромосомным набором (с отсутствием сигналов в случаях нуллисомии либо двумя сигналами в случаях дисомии). Использование смеси из двух проб не позволило дифференцировать диплоидные сперматозоиды и сперматозоиды с сегрегацией по типу 3:0.

Анализ мейотической сегрегации хромосом 13 и 14 у пяти мужчин с der(13;14) позволил обнаружить преобладание альтернативного типа сегрегации с образованием сбалансированных гамет. Средняя частота нормальных/сбалансированных сперматозоидов составила $78,2 \pm 5,7 \%$ и варьировала от 69,4 до 86,5 % (табл. 2).

Частота сперматозоидов с нуллисомией и дисомией хромосом 13 и 14 статистически не отличалась и соответствовала ожидаемому соотношению 1:1. Аналогичные результаты получены и в ряде других исследований [14, 16]. Однако существуют роботы, в которых выявлено повышение частоты нуллисомий относительно дисомий хромосом 13 и 14 в гаметах носителей der(13;14) [18–20]. Потеря сигнала вследствие низкой эффективности гибридизации может являться причиной артефактного повышения

частоты нуллисомий. Частоты дисомии хромосом 13 и 14 не отличались. Отсутствие разницы в частотах дисомии хромосом 13 и 14 ожидаемо, учитывая одинаковый размер хромосом, вовлеченных в перестройку.

Наши результаты согласуются с данными других исследователей о преимущественном расхождении хромосом по альтернативному типу в сперматозоидах носителей der(13;14) (табл. 3).

Преобладание альтернативного типа сегрегации гамет обусловлено образованием тривалента в профазе I мейоза с cis-конфигурацией, склонного к сегрегации по альтернативному типу [24]. Однако частота сбалансированных гамет для каждого из носителей индивидуальна и колеблется от 69,4 до 86,5 %. Показано, что частота несбалансированных сперматозоидов зависит от концентрации сперматозоидов: со снижением концентрации сперматозоидов возрастает риск образования несбалансированных гамет [16]. Более того, нарушение сегрегации хромосом, вовлеченных в транслокацию, может приводить к нарушению сперматогенеза, поскольку несбалансированный набор хромосом является фактором, задерживающим анафазу и приводящим к блоку клеточного цикла через апоптотический путь, как описано у мышей – носителей робертсоновских транслокаций [25]. Показано также повышение уровня маркеров

Таблица 3. Результаты исследования сегрегации хромосом у гетерозиготных носителей der(13;14)

Группа исследователей	Количество		Средняя частота сбалансированных сперматозоидов, %
	пациентов	проанализированных сперматозоидов	
Escudero et al. [18]	2	2022	75,5
Frydman et al. [19]	3	3116	89,36
Morel et al. [20]	3	5102	84,28
Ogur et al. [8]	7	5213	84,65
Kékesi et al. [21]	1	1629	90,9
Perrin et al. [22]	6	8775	86,07
Cassuto et al. [23]	2	200	84,93
Ferfour et al. [16]	11	9881	81,8
Mahjoub et al. [7]	5	842	71,5

апоптоза и фрагментации ДНК в сперматозоидах носителей робертсоновских транслокаций относительно фертильных доноров спермы [26]. Таким образом, разница в показателях спермограммы может обуславливать варьирование частот сбалансированных сперматозоидов у носителей робертсоновской транслокации der(13;14) в разных исследованиях.

Риск невынашивания и рождения ребенка с хромосомной патологией у носителей der(13;14) составляет 15 и 0,4 % соответственно [27]. По результатам инвазивной пренатальной диагностики беременностей носителей робертсоновских транслокаций несбалансированный кариотип плода определяют в 15 % случаев женщин – носителей транслокаций и в 2 % случаев мужчин-носителей [28]. Повышение частоты образования несбалансированных гамет у женщин показано в ограниченном количестве исследований [29]. Данные о повышении частоты образования несбалансированных гамет у женщин по сравнению с мужчинами получены также при исследовании вариантов сегрегации хромосом в эмбрионах носителей робертсоновских транслокаций [30]. Вероятно, в процессе созревания гамет у мужчин часть сперматозоидов с несбалансированным набором хромосом элиминируется. Тем не менее, учитывая достаточно высокую частоту образования несбалансированных гамет, носителям робертсоновских транслокаций следует рекомендовать преимплантационную генетическую диагностику. Селекция нормальных/сбалансированных эмбрионов у таких пациентов способствует не только повышению частоты наступления беременности, но и снижению рисков невынашивания и рождения ребенка с хромосомной патологией.

Выводы. У гетерозиготных носителей der(13;14) преобладает альтернативный тип сегрегации хромосом 13 и 14 с образованием сбалансированных гамет. Выявлено незначительное варьирование частот сбалансированных сперматозоидов (69,4–86,5 %) у пяти исследуемых пациентов. Полученные результаты можно использовать для медико-генетического консультирования гетерозиготных носителей наиболее частой робертсоновской транслокации der(13;14), особенно в репродуктивных клиниках перед использованием вспомогательных

репродуктивных технологий для прогнозирования вероятности получения нормальных/сбалансированных эмбрионов.

L.Y. Pylyp, L.A. Spinenko, V.D. Zukin, N.M. Bilko

Center of Molecular and Cell Research, National University of «Kyiv-Mohyla Academy», Kyiv
E-mail: l.pylyp@ivf.com.ua

Clinic of Reproductive Medicine «Nadiya», Kyiv

MEIOTIC SEGREGATION OF CHROMOSOMES 13 AND 14 IN SPERM OF HETEROZYGOUS ROBERTSONIAN TRANSLOCATION der(13;14) (q10; q10) CARRIERS

Meiotic segregation of chromosomes 13 and 14 was assessed by fluorescence in situ hybridization on sperm of five heterozygous carriers of the most frequent Robertsonian translocation der(13;14). Alternate segregation mode was predominant (mean $78,2 \pm 5,7$ %). The prevalence of balanced sperm varied from 69,4 to 86,5 %. Adjacent segregation mode was detected in $18,64 \pm 4,90$ % of sperm; 3:0 mode was detected in $2,48 \pm 1,20$ % of sperm. These results are informative for reproductive counseling of Robertsonian translocation der(13;14) carriers, providing information for assessment of probability of receiving normal/balanced embryos in assisted reproduction cycles.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nielsen J., Wohler M.* Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from 13-year incidence study in Arhus, Denmark // *Hum. Genet.* – 1991. – **87**, № 1. – P. 81–83.
2. *Testart J., Gautier E., Brami C. et al.* Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities // *Hum. Rep.* – 1996. – **11**, № 12. – P. 2609–2612.
3. *Therman E., Susman B., Denniston C.* The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations // *Ann. Hum. Genet.* – 1989. – **53**, № 1. – P. 49–65.
4. *Ravel C., Berthaut I., Bresson J.L., Siffiori J.P.* Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10 000 sperm donor karyotypes // *Hum. Rep.* – 2007. – **21**, № 6. – P. 1484–1489.
5. *Luciani J.M., Guichaoua M.R., Mattei A., Morazzani M.R.* Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility // *Cytogenet. Cell. Genet.* – 1984. – **38**, № 1. – P. 14–22.
6. *Vidal F., Templado C., Navarro J. et al.* Meiotic and synaptonemal complexes studies in a 14/21 translocation carrier // *Int. J. Androl.* – 1982. – **5**, № 1. – P. 21–26.
7. *Mahjoub M., Mehdi M., Brahem S. et al.* Chromo-

- somal segregation in spermatozoa of five Robertsonian translocation carriers t(13;14) // *J. Ass. Rep. Genet.* – 2011. – **28**, № 7. – P. 607–613.
8. *Ogur J., Van Assche E., Vegetti W. et al.* Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers // *Mol. Hum. Rep.* – 2006. – **12**, № 3. – P. 209–215.
 9. *An International system for human cytogenetic nomenclature 2009 / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature.* – Basel: Karger, 2009. – 130 p.
 10. *World Health Organization.* WHO manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. – Cambridge: Univ. press, 2000. – 286 p.
 11. *Martin R.H.* Cytogenetic analysis of sperm from male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation // *Hum. Genet.* – 1988. – **80**, № 4. – P. 357–361.
 12. *Ogawa S., Araki S., Araki Y. et al.* Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocyte // *Hum. Rep.* – 2000. – **15**, № 5. – P. 1136–1139.
 13. *Anton E., Vidal F., Blanco J.* Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers // *Hum. Rep.* – 2007. – **22**, № 8. – P. 2088–2092.
 14. *Moradkhani K., Puechberty J., Bhatt S. et al.* Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: A case report // *Hum. Reprod.* – 2006. – **21**, № 12. – P. 3193–3198.
 15. *Hatakeyama C., Gao H., Harmer K., Ma S.* Meiotic segregation patterns and ICSI pregnancy outcome of a rare (13;21) Robertsonian translocation carrier: a case report // *Hum. Rep.* – 2006. – **21**, № 4. – P. 976–979.
 16. *Ferfour F., Selva J., Boitrelle F. et al.* The chromosomal risk in sperm from heterozygous Robertsonian translocation carriers is related to the sperm count and the translocation type // *Fertil. Steril.* – 2011. – **96**, № 6. – P. 1337–1343.
 17. *Anton E., Blanco J., Egozcue J., Vidal F.* Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10) // *Hum. Rep.* – 2004. – **19**, № 6. – P. 1345–1351.
 18. *Escudero T., Lee M., Carrel D. et al.* Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers // *Prenat. Diagn.* – 2000. – **20**, № 7. – P. 599–602.
 19. *Frydman N., Romana S., Le Lorc'h M. et al.* Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation // *Hum. Rep.* – 2001. – **16**, № 11. – P. 2274–2277.
 20. *Morel F., Roux C., Bresson J.L.* FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype // *Mol. Hum. Rep.* – 2001. – **7**, № 5. – P. 483–488.
 21. *Kékesi A., Erdei E., Török M. et al.* Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers // *Fertil. Steril.* – 2007. – **88**, № 1. – P. 5–11.
 22. *Perrin A., Caer E., Oliver-Bonet M. et al.* DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality // *Fertil. Steril.* – 2009. – **92**, № 2. – P. 583–589.
 23. *Cassuto N.G., Foll N.L., Chantot-Bastaraud S. et al.* Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology examination // *Fertil. Steril.* – 2011. – **96**, № 4. – P. 826–832.
 24. *Sybenga J.* Chromosome structural variants // *General Cytogenetics / Ed. J. Sybenga* – Amsterdam: North-Holland Publ., 1975. – P. 165–212.
 25. *Eaker S., Pyle A., Cobb J., Handel M.A.* Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice // *J. Cell. Sci.* – 2001. – **114**, № 16. – P. 2953–2965.
 26. *Brugnon S., Janny L., Communal Y. et al.* Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients // *Hum. Rep.* – 2010. – **25**, № 7. – P. 1–12.
 27. *Scriven P.N., Flinter F.A., Braude P.R., Ogilvie C.M.* Robertsonian translocations – reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis // *Hum. Reprod.* – 2001. – **16**, № 11. – P. 2267–2273.
 28. *Stengel-Rutkowski S., Stene J., Gallano P.* Risk estimates in balanced parental reciprocal translocations // *Expansion scientifique française.* – Paris, 1988. – 144 p.
 29. *Munne S., Escudero T., Sandalinas M. et al.* Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations // *Cytogenet. Cell. Genet.* – 2000. – **90**, № 3/4. – P. 303–308.
 30. *Ko D.S., Cho J.V., Lee H.S. et al.* Preimplantation genetic diagnosis outcomes and meiotic segregation analysis of Robertsonian translocation carriers // *Fertil. Steril.* – 2013. – **99**, № 5. – P. 1369–1376.

Поступила 31.01.13